

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
PROF. DR. G. SCHMALZ
AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

BAKTERIENADHÄSION AN BIOMATERIALIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Rainer Schweiger

2011

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
PROF. DR. G. SCHMALZ
AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

BAKTERIENADHÄSION AN BIOMATERIALIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Rainer Schweiger

2011

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Helmut Schweikl
2. Berichterstatter:	PD Dr. Martin Rosentritt
Tag der mündlichen Prüfung:	21.12.2011

Für meine liebe Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	6
I Abkürzungsverzeichnis.....	9
II Abbildungsverzeichnis	11
III Tabellenverzeichnis	12
1. Einleitung.....	13
1.1 Bakterielle Adhäsion an Biomaterialien und ihre Folgen	13
1.2 Speichel und Biofilmentstehung	15
1.3 Eigenschaften von <i>Streptococcus gordonii</i>	18
1.4 Adhäsion von <i>S. gordonii</i> an orale Oberflächen	19
1.5 Proteinadhäsion auf Biomaterialien.....	21
2. Fragestellung.....	22
3. Material und Methoden	23
3.1 Material	23
3.1.1 Materialien	23
3.1.2 Mikroorganismen	25
3.1.3 Chemikalien.....	25
3.1.4 Lösungen.....	26
3.1.5 Materialienbeschreibung	27
3.1.5.1 Komposit (TetricEvoCeram).....	27
3.1.5.2 Silorankomposit (Filtek Siloran)	28
3.1.5.3 Glasionomerzemente (Ketac Molar)	29
3.1.5.4 Polymethylmethacrylat (PMMA).....	30
3.1.5.5 Silikon (Mucopren)	31
3.1.5.6 Cobalt-Chrom-Molybdän (Co28Cr6Mo)	32
3.1.5.7 Titan (Ti6Al4V)	33
3.1.5.8 Polytetrafluorethylen	34
3.1.5.9 Polyethylen	34
3.2. Methoden	35
3.2.1 Herstellung der Prüfkörper	35
3.2.1.1 Komposit (TetricEvoCeram).....	35
3.2.1.2 Silorankomposit (Filtek Siloran)	36
3.2.1.3 Glasionomerzemente (Ketac Molar)	36
3.2.1.4 Polymethylmethacrylat (PMMA).....	37

3.2.1.5 Silikon (Mucopren)	38
3.2.1.6 Cobalt-Chrom-Molybdän (Co ₂₈ Cr ₆ Mo) / Titan (Ti ₆ Al ₄ V)	38
3.2.1.7 Polytetrafluorethylen (PTFE)	39
3.2.1.8 Polyethylen (PE)	39
3.2.2 Eigenfluoreszenz von Werkstoffoberflächen	39
3.2.3 Nachweisreaktion von Bakterien	40
3.2.4 Speichel	41
3.2.5 Herstellung von Glycerinkulturen mit <i>S. gordonii</i>	42
3.2.6 Keimzahlbestimmung von <i>S. gordonii</i>	42
3.2.7 Minifold für Bakterienstandards	43
3.2.7.1 Vorbereitung der Standardlösung	43
3.2.7.2 Standardgewinnung	44
3.2.8 Bakterielle Adhäsion auf verschiedenen Werkstoffen und auf Nitro- zellulosemembran	45
3.2.8.1 Probenvorbereitung	45
3.2.8.2 Bakterielle Adhäsion	46
3.2.9 Nachweis von <i>S. gordonii</i> auf Prüfkörpern und Nitrozellulosemembranen	48
3.2.9.1 Benötigte Materialien	48
3.2.9.2 Vorbereitung im Labor	48
3.2.9.3 Durchführung des Nachweises in der Dunkelkammer	50
3.2.10 Quantifizierung der Adhäsion von <i>S. gordonii</i>	51
3.2.11 Netzwinkelbestimmung	52
3.2.12 Rasterelektronenmikroskopie	53
3.2.13 Statistik	53
4. Ergebnisse	55
4.1 Die Bestimmung von Netz winkeln	55
4.2 Bakterienadhäsion auf Biomaterialien	57
4.2.1 Bakterienstandardkurven	57
4.2.2 Bakterienadhäsion an Biomaterialien	58
4.2.3 Korrelationsanalysen	60
4.3 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	62
5. Diskussion	64
5.1 Prinzipien der Adhäsion oraler Biomoleküle	64
5.2 Hydrophobizität von Materialoberflächen und Proteinadsorption	66

5.2.1 Grundlagen.....	66
5.2.2 Die Benetzbarkeit von Oberflächen in Abhängigkeit adsorbierter Proteine	68
5.2.3 Eigenschaften der Oberfläche von <i>Streptococcus gordonii</i>	72
5.3 Methoden der Bakteriendetektion auf Oberflächen.....	74
5.4 Bakterienadhäsion auf unterschiedlichen Biomaterialien	76
5.4.1 Der Einfluss der Hydrophobizität reiner Werkstoffoberflächen auf die Adhäsion von Mikroorganismen	77
5.4.2 Der Einfluss einer Beschichtung von Werkstoffoberflächen mit Speichel auf die Adhäsion von Mikroorganismen	79
5.4.3 Die Adhäsion von Mikroorganismen auf den Werkstoffen	82
5.5 Ausblick: Materialien mit antibakteriellen Eigenschaften.....	89
5.6 Schlussfolgerung.....	90
6. Zusammenfassung	93
7. Literaturverzeichnis	96
8. Danksagung	111

I Abkürzungsverzeichnis

A-Silikon	Additionsvernetzendes Silikon
Bis-GMA	Bisphenol-A-diglycidyl-dimethacrylat
BSA	Bovines Serumalbumin
CoCrMo	Cobalt-Chrom-Molybdän
CPC	Cetylpyridinium chlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced Chemiluminescence
GIZ	Glasionomerzement
HDPE	High Density Polyethylene
HEMA	Hydroxyethylenmethacrylat
HSA	Humanes Serumalbumin
KBE	Kolonien bildende Einheiten
K-Silikon	Kondensationsvernetzendes Silikon
LDPE	Low Density Polyethylene
LLDPE	Linear Low Density Polyethylene
MDPB	12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromid
MDPE	Medium Density Polyethylene
MMA	Methylmethacrylsäure
NEM	Nichtedelmetall
NW	Netzwinkel
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Polyethylen
PE-HD-HMW	High Density High Molecular Weight Polyethylene

PE-HD-UHMW	High Density Ultra High Molecular Weight Polyethylene
PK	Prüfkörper
PLL-g-PEG	Poly(L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen
REM	Rasterelektronenmikroskop
SAM	Self-Assembled-Monolayer
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	TBS mit Tween
TEC	TetricEvoCeram
TEGDMA	Triethylenglycoldimethacrylat
UDMA	Urethandimethacrylat
UHMWPE	Ultra High Molecular Weight Polyethylene
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WS	whole saliva

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Eigenfluoreszenz von Prüfkörpern der verschiedenen Werkstoffe	40
Abbildung 2:	Veranschaulichung der Biotin-Avidin-Reaktion	41
Abbildung 3:	Die Anordnung von Prüfkörpern und Standard in einer Filmkassette zum Nachweis adhärenter Bakterien	49
Abbildung 4:	Quantifizierung der Adhäsion von <i>S. gordonii</i>	51
Abbildung 5:	Darstellung der Netzwinkelmessung bei hydrophiler und hydrophober Materialoberfläche	53
Abbildung 6:	Netzwinkel der Oberflächen von Biomaterialien mit Wasser	55
Abbildung 7:	Darstellung eines Bakterienstandards mit Eichkurve	57
Abbildung 8:	Die Adhäsion von <i>S. gordonii</i> auf Oberflächen von Biomaterialien	59
Abbildung 9:	Korrelationsanalyse der Zahl adhärrierender <i>S. gordonii</i> in Abhängigkeit von Netz winkeln unbeschichteter Materialien	60
Abbildung 10:	Korrelationsanalyse der Zahl adhärrierender <i>S. gordonii</i> in Abhängigkeit von Netz winkeln der Materialien nach Beschichtung mit humanem Speichel	61
Abbildung 11:	Korrelationsanalyse der Zahl adhärrierender <i>S. gordonii</i> in Abhängigkeit von der Speichelproteinmenge auf den Materialien	61
Abbildung 12:	Elektronenmikroskopische Aufnahme der Adhäsion von <i>S. gordonii</i> auf PTFE	62
Abbildung 13:	Elektronenmikroskopische Aufnahme der Adhäsion von <i>S. gordonii</i> auf Silikon	63
Abbildung 14:	Energieverlauf zwischen zwei Oberflächen in Abhängigkeit vom Trennungsabstand beschrieben nach der DLVO-Theorie	64
Abbildung 15:	Netzwinkel gegen Wasser auf Modelloberflächen	70

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Statistische Analyse der Netzwinkel auf den Materialien bei Beschichtung mit Speichel und PBS	56
Tabelle 2:	Statistische Analyse der Bakterienmengen auf den Materialien bei Beschichtung mit Speichel und PBS	59

1. Einleitung

1.1 Bakterielle Adhäsion an Biomaterialien und ihre Folgen

Dentale Prothesen, Implantate oder Füllungen sind in der heutigen Zeit aus dem täglichen Leben nicht mehr wegzudenken. Nach beispielsweise einem Unfall oder einer Krankheit dienen sie häufig zu einer adäquaten Versorgung für die Wiederherstellung von Struktur und Funktion beschädigter Gewebe. Der Erfolg dieser in den menschlichen Organismus eingebrachten körperfremden Biomaterialien hängt dabei wesentlich vom Einfluss spezifischer kontaminierender Bakterien ab [Müller *et al.*, 2007; Busscher *et al.*, 2010]. Auf den Oberflächen dieser Materialien entsteht bei Kontakt mit der Umwelt sehr rasch ein Biofilm [Busscher *et al.*, 2010]. Dabei wird das Material zunächst von Proteinen aus der umgebenden Gewebsflüssigkeit bedeckt. Die adsorbierten Proteine bilden die Voraussetzung für die weitere Adhäsion von Zellen und Bakterien. Proteine lassen sich im Blutplasma, im Blutserum, im Speichel, im Urin oder in der interstitiellen Flüssigkeit finden [Gottenbos *et al.*, 2002; Carl, 2010]. Das bekannteste Beispiel der Biofilmbildung im Bereich der Zahnheilkunde ist dabei die in der Mundhöhle gebildete Plaque auf Zähnen als einer natürlichen und auf Werkstoffen als einer künstlichen Oberfläche, welche aus Speichelbestandteilen, bakteriellen Stoffwechselprodukten, Nahrungsresten und Bakterienzellen besteht [Busscher *et al.*, 2010; Hellwig *et al.*, 2006].

Allerdings entsteht ein Biofilm nicht nur auf Biomaterialien in der Mundhöhle, sondern auch im restlichen Organismus [Busscher *et al.*, 2010]. Betrachtet man das große Feld der Medizin, führt die Adhäsion von Bakterien an ein eingebrachtes Biomaterial meist zu einer Abwehrreaktion des Organismus und somit häufig zu einem Misserfolg dieser Therapie. Ein wichtiges Beispiel sieht man vor allem bei in Kontakt mit Blut stehenden Prothesen, bei welchen es zur Kontamination kommen kann. Dies kann operativ, post-operativ während der Wundheilung oder auch auf hämatogenem Weg, bei Infektionen an anderen Stellen im Körper, geschehen. Da hämatogene Infektionen jederzeit auftreten können, wurden Biomaterial-Implantate in der Literatur auch als „mikrobielle Zeitbomben“ bezeichnet [Gottenbos *et al.*, 2002]. Ein Biofilm kann zur Ausbildung von Thrombosen, Infektionen, chronischen Entzündungen und, im schlimmsten Fall, zu einer Sepsis oder auch Endokarditis führen. Chronische Schmerzen, Schwellungen, Verlust des Implantates und auch der Tod können die

Folge sein. Die Inzidenz für solche „Biomaterial-Infektionen“ kann nach Gottenbos stark variieren, wobei es Schätzungen von 4% für Hüftprothesen bis hin zu 100% bei Kathetern im Urinaltrakt drei Wochen nach dem Einsetzen gibt [Gottenbos *et al.*, 2002]. Gingivitis, Sekundärkaries und Pulpenschädigung sind im Bereich der Zahnmedizin die Folgen der Anlagerung von Bakterien an Füllungsmaterialien. Weiterhin kann die Adhäsion von Bakterien an Implantate eine Periimplantitis auslösen oder bei Anhaftung an kieferorthopädische Brackets den Zahnschmelz schädigen [Heuer *et al.*, 2007; Hannig und Hannig, 2009; Bürgers *et al.*, 2010; Busscher *et al.*, 2010; Hahnel *et al.*, 2010].

Die Biofilmentstehung in der Mundhöhle unterscheidet sich von derjenigen auf anderen Geweben. So ist das Milieu der Mundhöhle darauf ausgelegt, dass Oberflächen von einer Vielzahl an verschiedenen mikrobiologischen Stämmen und Spezies besiedelt werden. Krankheiten entstehen nur, wenn das Gleichgewicht dieses Systems gestört wird. Weiterhin sind die Oberflächen im Mund den Mikroorganismen ständig ausgesetzt, weil sie in hoher Zahl im Speichel vorkommen. Dagegen ist die Umgebung anderer Implantate, beispielsweise Hüft-, Knie- oder Gefäßprothesen, normalerweise frei von Mikroorganismen. Außerdem können Bakterien der Mundhöhle einfach mit der Zahnbürste entfernt werden und es baut sich daher immer wieder täglich ein neuer Biofilm auf. Wenn allerdings biomedizinische Implantate befallen sind, können diese nur aufwendig und oft mittels chirurgischem Eingriff, verbunden mit hohen Kosten und Leid für Patienten, wieder entfernt werden [Gottenbos *et al.*, 2002; Busscher *et al.*, 2010].

Daher ist es ein Ziel der aktuellen Forschung, zahnmedizinische und medizinische Materialien mit Eigenschaften zu entwickeln, welche das Bakterienwachstum vermindern und somit die Entstehung eines infektiösen Biofilms auf den Materialoberflächen verhindern können. So wurden hier beispielsweise anti-adhäsive und antibakterielle Oberflächen und solche, welche kontinuierlich Antibiotika abgeben, entwickelt [Gottenbos *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2007; Hannig und Hannig, 2009; Busscher *et al.*, 2010]. Für dieses ambitionierte Vorhaben ist es allerdings nötig, zunächst ein Grundverständnis über Speichel, Biofilmentstehung und Bakterien zu erlangen.

1.2 Speichel und Biofilmentstehung

Speichel wird in seiner Gesamtheit hauptsächlich von den drei großen, jeweils paarig angelegten Speicheldrüsen des Menschen (*glandula parotis*, *glandula sublingualis*, *glandula submandibularis*) gebildet. Außerdem sind auch zahlreiche kleinere akzessorische Speicheldrüsen an der Speichelbildung beteiligt [van Rensburg, 1994].

Die Innervation der Speicheldrüsen erfolgt durch das vegetative Nervensystem und variiert die Zusammensetzung des Speichels. Eine Aktivierung des Parasympathikus erzeugt in allen Drüsen die Sekretion eines dünnflüssigen, glykoproteinarmen Speichels, die Erregung des Sympathikus bewirkt die Sekretion geringer Mengen eines viskösen, Mucin-, K^+ - und HCO_3^- -reichen Speichels [Vaupel, 2007].

Täglich wird eine Gesamtmenge von etwa 0,7 l Speichel produziert, welche von emotionalen, psychischen und Umweltfaktoren abhängig ist. Der Speichelfluss wird durch die Kautätigkeit oder die Reizung der Geschmacksrezeptoren angeregt. Andererseits kann eine Verminderung der Speichelsekretion beispielsweise durch verschiedene Medikamente, Autoimmunkrankheiten (Sjögren-Syndrom, Sarkoidose), Bestrahlungstherapie, psychogene Störungen, ausgeprägte Immunschwäche (AIDS) oder durch ein vermindertes Kauvermögen verursacht sein [Kielbassa, 2006].

Speichel, der die gesamte Mundhöhle mit einem 0,1 µm dünnen Film auskleidet, besteht zu etwa 99% aus Wasser und nur zu 1% aus festen Bestandteilen, nämlich anorganischen und organischen Substanzen [Hellwig *et al.*, 2006].

Anorganische Bestandteile sind dabei hauptsächlich unterschiedliche Elektrolyte wie Natrium, Chlorid, Kalzium, Kalium, Magnesium, Phosphat, Hydrogenkarbonat und Fluoride [van Rensburg, 1994; Kielbassa, 2006; Hellwig *et al.*, 2006; Vaupel, 2007].

Die wichtigsten organischen Bestandteile des Speichels sind Enzyme (alpha-Amylase), Proteine (Lysozym, Lactoferrin, Peroxidase) und Glykoproteine, beispielsweise Muzine, Statherin, saure prolinreiche Proteine, Agglutinine, histidinreiche Proteine, Cystatine, Defensine und Immunglobuline [Walz *et al.*, 2006; Hellwig *et al.*, 2006]. Darüber hinaus enthält Speichel unter anderem auch noch Bakterien, Zelltrümmer und Sulkusflüssigkeit [Kielbassa, 2006; Walz *et al.*, 2006].

Zu den Funktionen des Speichels gehört vor allen Dingen die Aufrechterhaltung einer physiologischen Mundflora. Durch antimikrobielle Aktivität, die Abpufferung von Säuren, Remineralisation und Beschichtung harter und weicher Gewebe fungiert der

Speichel als wichtiges Schutzsystem. Die kontinuierliche Speichelabgabe dient der Selbstreinigung der Mundhöhle und außerdem erfolgt über den Speichel die Andauung aufgenommener Nahrung sowie die Bildung eines Nahrungsbolus als Vorbereitung für den Schluckakt [Walz *et al.*, 2006].

Weiterhin gehören Speichelbestandteile zur dentalen Plaque. Dieser strukturierte Zahnbelag ist ein Biofilm, der vor allem aus Bakterien und Komponenten des Speichels besteht, aber auch bakterielle Stoffwechselprodukte und Nahrungsreste enthält. Er lagert sich sowohl an Zahn- als auch an Werkstoffoberflächen an, kann nicht durch Spülen oder mit einem Wasserspray entfernt werden und führt schließlich zu bakterieller Schädigung der Zahnhartsubstanz [Hellwig *et al.*, 2006].

Dabei entsteht zunächst unmittelbar nach der Zahnreinigung wieder das *acquired pellicle*, eine initiale Schicht aus an Oberflächen adsorbierten Proteinen (darunter Enzyme und Glykoproteine), Lipiden und anderen organischen Komponenten. Dieser Prozess ist komplex und von chemischen und physikalischen Einflüssen abhängig [Hannig und Hannig, 2009].

Die ersten adsorbierten Proteine an der Zahnoberfläche sind Phosphoproteine mit hoher Affinität, beispielsweise Statherin, Histatin und prolinreiche Proteine [Hannig und Hannig, 2009]. Man vermutet, dass die Adsorption dieser Proteine durch eine Kalzium- und Phosphatschicht auf der Schmelzoberfläche vermittelt wird. Neben ionischen Bindungen wirken dabei Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen [Hannig und Hannig, 2009]. Man nimmt an, dass diese frühe Pellikelbildung innerhalb von zwei Stunden erfolgt. Dieses Pellikel bleibt jedoch nicht starr und stabil, sondern unterliegt permanenten Modifikationen und ist in seiner Zusammensetzung wohl selbst abhängig von Oberflächeneigenschaften. Veränderungen in der Pellikel basieren auch auf Enzymaktivitäten, die Proteine abbauen oder verändern. Dabei können Liganden für Rezeptoren auf den Oberflächen von Bakterien verändert werden oder neu entstehen. Das Pellikel entsteht so auf dem Zahnschmelz, dem Zement und auf restaurativen Werkstoffen, aber auch auf der Mundschleimhaut und auf Oberflächen von Mikroorganismen selbst [Lendenmann *et al.*, 2000].

Die folgende zweite Phase der Pellikelbildung ist durch die kontinuierliche Adsorption verschiedener Biomoleküle und Mikroorganismen aus dem Speichel gekennzeichnet. Diese bilden schließlich irreversible, spezifische Bindungen zum *acquired pellicle* [Hannig und Hannig, 2009].

Bemerkenswert ist die hohe Selektivität der Bildung dieser Pellikel, ein weitgehend bakterienfreier Biofilm, denn es enthält nur einen Bruchteil sämtlicher Speichelproteine [Hannig und Hannig, 2009].

Die Eigenschaften des Pellikels sind doppelter Art. Einerseits fungiert es als Schmiermittel, antierosive Grenze und Puffer durch antibakterielle Proteine wie Lactoferrin, Cystatin und Lysozyme. Andererseits fördern einige Pellikel-Bestandteile wie Amylase, prolinreiche Proteine, Fibrinogen, Lysozyme oder Muzin MG 2, als spezifische Rezeptoren die Bakterienadhäsion [Müller *et al.*, 2007; Hannig und Hannig, 2009].

Die Adhäsion von Bakterien an der Pellikeloberfläche verläuft im Unterschied zur Proteinadsorption an die Zahnoberfläche deutlich langsamer und in mehreren Phasen (vgl. Kapitel 1.4). Die Anbindung der Bakterien erfolgt durch Fimbrien und spezifische Rezeptor-Adhäsions-Reaktionen, aber auch über hydrophobe Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoff- und Kalziumbrücken oder elektrostatische Wechselwirkungen und Säure-Basen-Reaktionen [Hannig und Hannig, 2009]. Zu den ersten Bakterien, die die Zahnoberfläche kolonisieren, zählen *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* und *Streptococcus gordonii*, die deshalb als Erstbesiedler bezeichnet werden. Auch *Streptococcus mutans*, ein wichtiger Keim für die Entstehung von Karies, wurde schon in der jungen Plaque nachgewiesen [Müller *et al.*, 2007; Kreth *et al.*, 2008; Bürgers *et al.*, 2009; Periasamy und Kolenbrander, 2009]. In der initialen Phase der Kolonisation dominieren die Streptokokken in der Plaque, doch im weiteren Verlauf kommt es zu gravierenden Änderungen. Durch Koaggregation und Koadhäsion besiedeln nach und nach mehr fakultativ anaerobe Bakterien die Zahnoberfläche und nach etwa neun Tagen finden sich hauptsächlich obligat anaerobe Keime in der Plaque. Die dominierenden Spezies sind nun Aktinomyzeten, *Veillonella* und Lactobazillen auf einer von Streptokokken vorbereiteten initialen Struktur. Die Plaque wird mit zunehmendem Alter dicker, und es bilden sich mehrzellige, von verschiedenen Spezies durchzogene Bakterienlagen [Kielbassa, 2006; Hellwig *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2007; Zijnga *et al.*, 2010]. Die Zusammensetzung des bakteriellen Biofilms begünstigt die steigende Antibiotikaresistenz und ist demzufolge verantwortlich für bakterielle Infektionen. Dennoch sind die allerersten Vorgänge der bakteriellen Adhäsion wohl entscheidend für den Erfolg eines Biomaterials [Gottenbos *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2007].

1.3 Eigenschaften von *Streptococcus gordonii*

Streptokokken sind kugel- bis ovalförmige Zellen, die in Ketten oder als Paare angeordnet sind. Alle Spezies sind unbeweglich, nicht-sporenbildend und katalase-negativ, mit komplexen Ernährungsanforderungen. Streptokokken sind alle gram-positiv und fakultativ anaerob und können in Gegenwart von Luftsauerstoff wachsen, manche benötigen jedoch Kohlendioxid für ein optimales Wachstum. Alle Streptokokkenspezies vergären Glucose und produzieren Milchsäure, können aber Nitrat nicht abbauen. Streptokokken sind Bestandteile der Mikroflora auf Schleimhautmembranen oder Zahnoberflächen, und manche Spezies sind hochpathogen. Einige Spezies besiedeln speziell Zahnoberflächen und lassen sich erst nach dem Zahndurchbruch nachweisen [Kilian, 2005].

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Keim *S. gordonii* zählt zur Gruppe der *S. sanguinus*, welcher außerdem noch *S. sanguinus*, *S. parasanguinus* und *S. massiliensis* angehören. Diese Bakterien bewirken eine alpha-Hämolyse (Vergrünung) und werden daher als nicht hämolysierende, orale oder vergrünende Streptokokken bezeichnet und zur Gruppe der *Viridans*-Streptokokken gerechnet [Burkhardt *et al.*, 2009]. Die derzeitige Differenzierung beruht auf molekularbiologischen Untersuchungen, vor allem der Sequenzierung der 16S-rRNA. Man unterscheidet die vergrünenden Streptokokken in die *S. mutans*-, *S. salivarius*-, *S. anginosus*-, *S. mitis*- und die bereits erwähnte *S. sanguinus*-Gruppe. Des weiteren werden die *S. equinus/bovis*- und die *S. suis*-Gruppe genannt [Burkhardt *et al.*, 2009].

Isolate der *S. sanguinus*-Gruppe sind durch ihre 16S-rRNA sehr nahe mit der *S. mitis*-Gruppe verwandt. Eine Abgrenzung zu anderen *Viridans*-Streptokokken ist möglich mithilfe der Arginin- und Esculinverwertung [Burkhardt *et al.*, 2009].

Mitglieder der *Viridans*-Streptokokken sind häufig als Infektionserreger bei der infektiösen Endokarditis beteiligt, vor allem *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. sanguis* und *S. mutans* [Kilian, 2005; Burkhardt *et al.*, 2009]. Die Streptokokkenendokarditis betrifft meist vorgeschädigte Herzklappen älterer Patienten mit vorbestehenden Herzerkrankungen [Burkhardt *et al.*, 2009].

Darüber hinaus kann diese Spezies auch die sogenannte „*S. viridans*-Sepsis“ bei neutropenischen Patienten hervorrufen mit den Symptomen Fieber, Hypotension, Schock, Pneumonie sowie Atemnot-Syndrom und einer Sterblichkeitsrate bis zu 30%. Orale Infektionen hingegen sind selten [Kilian, 2005; Burkhardt *et al.*, 2009].

Der Anteil der Streptokokken an der mikrobiellen Flora der Mundhöhle wird auf etwa 20% geschätzt. Neben dem Abbau von Kohlenhydraten ist die Bildung antimikrobieller Stoffe, wie Bakterizide oder auch Wasserstoffperoxid interessant. So wurde berichtet, dass *S. sanguinis* und *S. gordonii* der Spezies *S. mutans* schaden und so zur Verhinderung von Karies beitragen können [Kreth *et al.*, 2008]. Für die vorliegende Arbeit ist relevant, dass Streptokokken um die Bindungsstellen auf der Zahnoberfläche konkurrieren [Kreth *et al.*, 2008].

Wie bereits erwähnt, gelten *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. oralis* und die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *S. gordonii* als sogenannte Erstbesiedler auf Zahnoberflächen [Müller *et al.*, 2007; Kreth *et al.*, 2008; Bürgers *et al.*, 2009].

1.4 Adhäsion von *S. gordonii* an orale Oberflächen

Eine initiale Adhäsion oraler Bakterien an natürlichen und künstlichen Oberflächen der Mundhöhle wird zunächst durch den kontinuierlichen Speichelfluss eingeleitet. Der zufällige Kontakt von Bakterien mit Oberflächen geschieht hier passiv durch Brown'sche Bewegungen, Sedimentation oder Flüssigkeitsströmung und ist teilweise durch aktive Bewegung vitaler Mikroorganismen begünstigt [Scheie, 1994]. Für diese Phase der Adhäsion von Bakterien werden einerseits Einflüsse der Topographie von Oberflächen diskutiert. Andererseits wird die Adhäsion vor allem auch von physikochemischen Kräften zwischen den Oberflächen der Gewebe oder Restaurationen und den Bakterien selbst bestimmt. Dazu zählen hydrophile Wechselwirkungen über Van-der-Waals-Kräfte und elektrostatische Interaktionen zwischen geladenen Gruppen auf Oberflächen wie Wasserstoffbrücken, aber auch hydrophobe Wechselwirkungen der Oberflächen. Eine feste und irreversible Bindung der Bakterien an die Oberfläche erfolgt dann, wenn die Bakterien aufgrund dieser physikochemischen Parameter und Kräfte eng an eine Oberfläche binden und in der Folge eine spezifische Bindung stereochemisch über eine Rezeptorbindung möglich wird [Busscher und van der Mei, 1997]. Nicht gut charakterisiert ist bis heute der Anteil hydrophober Komponenten auf der Bakterienoberfläche, die durch die Verdrängung von Wasser einen engen Kontakt mit der Oberfläche herstellen würden [Marsh und Bradshaw, 1995]. Das klassische Paradigma favorisiert die Bindung von Streptokokken als initiale Besiedler über Rezeptoren an Komponenten der

Pellikelschicht. Es wurde spekuliert, dass die initiale Plaquebildung in zwei Stufen erfolgt. Zunächst sollten Bakterien über Oberflächenadhäsine an Pellikelkomponenten adhären und anschließend sollte die Adhäsion später Besiedler über Zell-Zell-Bindungen in einem Prozess, der als Coadhäsion bezeichnet wurde, erfolgen [Ritz *et al.*, 1967; Listgarten *et al.*, 1975; Listgarten, 1994; ten Cate, 2006].

Die oberflächenassoziierten Adhäsine der Bakterien sind letztlich entscheidend für die initiale Adsorption der Proteine des Speichels im Pellikel. Adhäsine sind als Oberflächenproteine oder auf fibrillären Anhängen dentaler Mikroorganismen exprimiert. Heute sind Proteine der Antigen I/II-Familie oraler Streptokokken, Typ 1- und Typ 2-Fimbrien der Actinomyceten, Proteine der Lral-Familie, Fap1, amylasebindende Proteine und Oberflächenlectine gut charakterisiert [Rosan und Lamont, 2000]. Umgekehrt zählen die prolinreichen Proteine, die prolinreichen Glykoproteine, Statherin, Agglutinin gp-340, alpha-Amylase, Immunglobuline Lactoferrin und Speichelmuzine zu den Proteinen, von denen man annimmt, dass sie Erstbesiedler binden können [Scannapieco, 1994]. Dabei ist die Wechselwirkung zwischen potentiellen Liganden und Adhäsin durchaus nicht linear. So wurde beispielsweise beobachtet, dass PRP-1 (saure prolinreiche Proteine), wenn sie an Oberflächen gebunden sind, an Typ 1-Fimbrien von *Actinomyces naeslundii* binden können. Diese Bindung unterbleibt jedoch, wenn das Protein im Speichel gelöst vorliegt [Scheie, 1994].

Die Analyse der Adhäsion von Streptokokken der *Viridans*-Gruppe an mit Speichel behandeltes Hydroxylapatit (Hydroxyliertes Kalziumphosphatsalz) ließ sehr bald vermuten, dass die Bakterien an Rezeptoren wie Muzin MG2 (MUC7) und PRP mit endständiger Sialinsäure (*N*- und *O*-Derivate der Neuraminsäure) binden könnten [Gibbons *et al.*, 1985]. Das sialinsäurebindende Adhäsin von *Streptococcus gordonii* DL1 wurde dann als ein serinreiches Protein identifiziert [Takahashi *et al.*, 2002].

Es besteht nun kein Zweifel, dass *S. sanguis*, *S. gordonii* und *A. naeslundii* spezifisch an Speichelkomponenten wie MG2 und PRP-1 binden können. Allerdings bleibt unklar, ob diese Keime auch andere Proteine binden könnten, obwohl sie einige andere Speichelproteine erkennen, die bisher jedoch nicht näher identifiziert wurden [Ruhl *et al.*, 2004].

1.5 Proteinadhäsion auf Biomaterialien

Da die stabile mikrobielle Besiedlung von Oberflächen, wie oben diskutiert, oft von Proteinen vermittelt wird, wurde parallel zur vorliegenden Arbeit die Adsorption an unterschiedlichen medizinischen und zahnmedizinischen Biomaterialien untersucht. Dabei wurden die Oberflächenparameter Benetzbarkeit mit Wasser und Rauigkeit (Topographie) der Materialien berücksichtigt. Als Maß der Hydrophobizität glatter Oberflächen der Prüfkörper wurden Netzwinkel gegen Wasser bestimmt. Stark hydrophob waren die Oberflächen von Polytetrafluorethylen, Silikon und Polyethylen mit Netzwinkeln zwischen 118,5° und 110°; Polymethylmethacrylat, Filtek Siloran, TetricEvoCeram, Titan und Cobalt-Chrom-Molybdän wurden wegen ihrer Netzwinkel von 65° bis 72° als schwach hydrophob eingestuft und der Glasionomerzement Ketac Molar mit einem Netzwinkel von 50,5° als hydrophiles Material [Carl, 2010].

Die stark hydrophoben Biomaterialien Polytetrafluorethylen und Polyethylen adsorbierten 37- ($0.185 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beziehungsweise 12,5- mal so viel Proteine aus dem Speichel verglichen mit den Mengen an adsorbiertem HSA (humanes Serumalbumin). Außerdem adsorbierten Polytetrafluorethylen und Polyethylen deutlich weniger HSA als die weniger hydrophoben Biomaterialien Polymethylmethacrylat, TetricEvoCeram, Titan, Cobalt-Chrom-Molybdän und Filtek Siloran. Auch wurde bei den Werkstoffen Polymethylmethacrylat, Silikon, Ketac Molar, Titan und Filtek Siloran eine deutlich höhere Speicheladsorption nachgewiesen. Nur auf Cobalt-Chrom-Molybdän konnte als einzigem der Biomaterialien eine höhere Proteinadsorption von HSA als von Speichel nachgewiesen werden [Carl, 2010].

Auf dieser Basis baut die vorliegende Arbeit auf. Eine ausführliche Diskussion der Adhäsion von Bakterien auf dentalen Werkstoffen darf hier nicht fehlen und wird im Diskussionsteil (vgl. Kapitel 5.4) präsentiert.

2. Fragestellung

In der Zahnmedizin sind restaurative Werkstoffe mit einer geringen Neigung zur Adhäsion von Bakterien und der Ausbildung eines Biofilms wünschenswert. Damit könnte das Risiko von Sekundärkaries oder Erkrankungen des Parodonts reduziert werden. Auch in anderen Bereichen der Medizin, in denen Biomaterialien zur Anwendung kommen, kann eine bakterielle Kontamination und Infektion die Funktion des Biomaterials gefährden und eine erhebliche Beeinträchtigung der Gesundheit von Patienten bedeuten.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Adhäsion von *S. gordonii* DL1 auf medizinischen und zahnmedizinischen Biomaterialien analysiert werden. Dazu wurden folgende Teilprojekte bearbeitet:

1. Quantifizierung der Adhäsion von *S. gordonii* DL1 auf Biomaterialien in Phosphatpuffer oder nach Beschichtung mit humanem Speichel.
2. Relation der Menge adhärenter Bakterien zur Hydrophilie der Materialoberflächen mit und ohne Beschichtung mit Speichel.

Die Adhäsion der Bakterien wurde auf Polytetrafluorethylen (PTFE), Polyethylen (PE), Polymethylmethacrylat (PMMA), Silikon (Mucopren), einem dentalen Komposit (TetricEvoCeram), Glasionomierzement (Ketac Molar), Titan (Ti6Al4V), Cobalt-Chrom-Molybdän (Co28Cr6Mo) und einem Silorankomposit (Filtek Siloran) geprüft.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Materialien

Getestete Biomaterialien

- Silorankomposit: Filtek Siloran, Bestellnummer: 4772A3, LOT-Nummer: 20080916, 3M ESPE AG, Seefeld
- Komposit: TetricEvoCeram, LOT-Nummer: L53323, Ivoclar Vivadent, Schaan, Lichtenstein
- Glasionomerzement: Ketac Molar, Bestellnummer: 56420, LOT-Nummer: 339680, 3M ESPE AG, Seefeld
- PMMA: Palapress, Flüssigkeit Bestellnummer: 64707784, LOT-Nummer: 021060, Pulver Bestellnummer: 64707798, LOT-Nummer: 022512, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau
- Silikon: Mucopren soft, Bestellnummer: 28105, LOT-Nummer: 80191, Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg
- Co28Cr6Mo-Legierung: ISO-Nummer: 5832-12, Zimmer GmbH, Winterthur, Schweiz
- Ti6Al4V-Legierung: ISO-Nummer: 5832-3, Zimmer GmbH, Winterthur, Schweiz
- Polyethylen: UHMWPE, ISO-Nummer: 5834-1/-2, Zimmer GmbH, Winterthur, Schweiz
- Polytetrafluorethylen: Werkstatt Chemie, Universität Regensburg

Geräte und Materialien im Labor

- Ausstrich Agar: Columbia Grund Agar, defibriniert, 8% Schafanteil, Merck, Darmstadt
- Cellophan: Artikelnummer: 5050, Deti Qualitätsprodukte, Meckesheim

- Eppendorfcentrifuge 54115C, Eppendorf, Hamburg
- Ersatz-O-Ringe: Bestellnummer: 10447902 , Schleicher und Schuell, Dassel
- Falcon tubes: Falcon Nr.: 352070 und 352096, Falcon, Blue Max Centrifuge tubes, BD Biosciences
- Film-Entwicklungsautomat: Curix 60, Gerätenummer: 38818, Agfa, Mortsel, Belgien
- Filmkassette: Hypercassette 8x10 inches, Bestellnummer: RPN 11649, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
- Filterpapier: Chromatographiepapier 58 x 68 cm, Bestellnummer: 9.028.313, VWR International, West Chester, PE, USA
- Fluoreszenzscanner: Typhoon 9400, GE Healthcare, Freiburg
- Fotoschalen: Bestellnummer: 230570423, Bürkle-LaboPlast, Bad Bellingen
- Gel-Blotting-Paper GB 003: Bestellnummer: 10426896, Schleicher und Schuell, Dassel
- Ketac Molar-Aktivator und Ketac Molar-Aplicator: 3M ESPE, Seefeld
- Membran-Vacuumpumpe: ME 4R, Vacuubrand, Wertheim
- Minifold 1: Dot-Blot-System/Derlan-SRC 96, Bestellnummer: 10447910, Schleicher und Schuell, Dassel
- Netzwinkelmessgerät: P1 Goniometer, Erna Inc., Tokio, Japan
- Nitrozellulose-Membran: Bestellnummer: 10402588, Schleicher und Schuell, Dassel
- Orbitalschüttler: Edmund Bühler, Tübingen
- Photometer: Ultrospec 3300 pro, UV/Visible Spectrophotometer, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
- Polymerisationslampe: Dentsply Curing Light, Bestellnummer: 14754, Modellnummer: 201 RE, Dentsply De Trey, Konstanz
- Präzisionswaage: MC 210P, Sartorius, Göttingen
- Rasterelektronenmikroskop: FEI Quanta 400F, Eindhoven, Holland
- Röntgenfilme: Kodak BioMax Light-2, Bestellnummern: V1917012 und V8689358, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
- Scanner: Image Scanner, Seriennr.: 01167296, Modell: Power Look 1120 USG, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK

- Speichelfilter: Acrodisc 32 mm Syringe Filter, Porengröße: 1,2 µm, 0,45 µm, 0,2 µm Supor Membrane, Bestellnummern: 829001, 828301, 815501, Pall Corporation, Life Sciences, Port Washington, NY, USA
- Ultraschall: Sonorex Super RK 102 P, Bandelin, Berlin
- Vortex-Vibrationsschüttler, VF2, Janke und Kunkel, Staufen
- Zellkulturplatten: 24-Wellplatten Bestellnummer: 662102, 96 Wellplatten Bestellnummer: 439454, Greiner bio-one, cellstar, Frickenhausen

3.1.2 Mikroorganismen

In sämtlichen Versuchen wurde der Keim *Streptococcus gordonii* DL1 verwendet.
Technische Daten:

Glycerinkultur *S. gordonii*: *Streptococcus gordonii* DL1 Biovar 2, Glycerin 87%, CAS-Nr.: 56-81-S

3.1.3 Chemikalien

- Aceton: Bestellnummer: 1.00014.1011, Merck, Darmstadt
- Avidin D: gelagert bei 4°C, Bestellnummer: A-2000, Vector, Loerrach
- Biotin: Sulfo-NHS-LC-Biotin, gelagert bei -20° C, Bestellnummer: 21335, Pierce, Rockford, IL, USA
- DMSO: A.C.S. spectrophotometric grade 99,9%, 100 ml, Bestellnummer: 154938, Sigma, St. Louis, Missouri, USA
- ECL: enhanced chemiluminescence, Bestellnummer: RPN2109, GE Healthcare/ Western Blotting Analysis System, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
- Ethanol: Bestellnummer: 8006, J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA
- HCl konzentriert: Bestellnummer: M317, Merck, Darmstadt
- Horseradish Peroxidase Avidin D: gelagert bei 4°C, Bestellnummer: A-2004, Vector/Linaris, Loerrach
- Nährmedium: 237500, Bacto Brain Heart Infusion, BD Biosciences
- Na₂B₄O₇ x 10 H₂O: Bestellnummer: M6308, Merck, Darmstadt

- NaCl: Bestellnummer: M6404, Merck, Darmstadt
- NaHCO₃: Bestellnummer: 30532929216, Merck, Darmstadt
- NaH₂PO₄: Bestellnummer: M6346, Merck, Darmstadt
- NaH₂PO₄ x 12 H₂O: Bestellnummer: M6579, Merck, Darmstadt
- Toluol: Bestellnummer: 1.083251000, Merck, Darmstadt
- Tris: Bestellnummer: USB22643, USB, Cleveland, OH, USA
- Tween20: Bestellnummer: 170-6531, Bio-Rad Laboratories, München

3.1.4 Lösungen

Nährmedium

37 g Nährmedium-Pulver in 1 Liter Aqua demin. lösen

TRIS-HCl-Puffer[1M]

121,4 g TRIS in 800 ml Aqua demin. lösen, mit HCl konz. (ca. 90 ml) auf pH 7,6 einstellen, Lösung mit Aqua demin. auf 1 Liter auffüllen und autoklavieren

NaCl[5M]

292,2 g NaCl in 800 ml Aqua demin. lösen, Lösung mit Aqua demin. auf 1 Liter auffüllen und autoklavieren

TBS (Tris Buffered Saline)[50mM]

50 ml 1M TRIS-HCl (pH 7,6), 30 ml 5 M NaCl

Die Lösung wird mit Aqua demin. auf 1 Liter aufgefüllt

TBS-Tween(0,1%)(TBST)-Puffer

1 Liter TBS- Puffer [50mM] mit 1 ml Tween20 mischen

0,9 % Kochsalzlösung

9 g NaCl in 800 ml Aqua demin. lösen, auf 1 Liter mit Aqua demin. auffüllen und autoklavieren

PBS(Phosphate-buffered saline)-Puffer(10x)

85 g NaCl + 7,73 g NaH₂PO₄ + 48,4 g NaH₂PO₄ x 12 H₂O; in 800 ml Aqua demin.
lösen; Lösung auf 1 Liter auffüllen und autoklavieren

PBS(Phosphate-buffered saline)-Puffer(1x)

100 ml PBS(10x) + 900 ml Aqua demin.

Film-Entwicklerlösung

Agfa (Mortsel, Belgien), Developer G153 A und Developer G153 B,
Zusammensetzung: 1,25 Liter Aqua demin. + 1 Liter G153 A + 0,25 Liter G153 B

Film-Fixierlösung

Agfa (Mortsel, Belgien), Name: Rapid Fixer G354, Zusammensetzung: 2 Liter Aqua demin. + 0,5 Liter G354

3.1.5 Materialienbeschreibung

3.1.5.1 Komposit (TetricEvoCeram)

Dentale Komposite sind zahnfarbene, plastische Füllungswerkstoffe. Diese Werkstoffe werden nach dem Einbringen in eine Kavität chemisch oder durch Energiezufuhr ausgehärtet.

Die Hauptbestandteile der Komposite sind die organische Matrix, die disperse Phase (Füller) und die Verbundphase (Silane, Kopolymere) [Craig *et al.*, 2006; Hellwig *et al.*, 2006].

Die organische Matrix besteht aus der Monomerklasse der multifunktionellen Methacrylate (z.B. Bis-GMA, UDMA und TEGDMA), welche vor allem für die chemischen Eigenschaften wie Wasseraufnahme, Schrumpfung, Polymerisationsgrad und Viskosität verantwortlich ist und den Initiatoren, die durch Aktivierung in Radikale zerfallen, dadurch Polymerketten bilden und somit für die vollständige Aushärtung entscheidend sind. Weiterhin enthält die Matrix Stabilisatoren, die eine vorzeitige Polymerisation verhindern, sowie Pigmente und andere Additiva wie

Weichmacher, Lichtschutzmittel und optische Aufheller [O'Brien, 2002; Hellwig *et al.*, 2006].

Zur Verbesserung der physikalischen und mechanischen Eigenschaften der Matrix werden ihr anorganische Füllstoffe unterschiedlicher Größe (Makro-, Mikro- und Nanofüller) zugesetzt, welche hauptsächlich aus fein gemahlenem Quarz, Borosilikat, Lithium-Aluminium-Silikat-Gläsern und aus hochdispersem, amorphem Siliziumdioxid bestehen [O'Brien, 2002; Schmalz, 2005; Hahnel *et al.*, 2010]. Dadurch wird die Druck- und Biegefestigkeit, die Härte, der E-Modul (Elastizitätsmodul) und die Beständigkeit des Materials verbessert [O'Brien, 2002; Craig *et al.*, 2006]. Durch die Verwendung von trifunktionellen Alkoxysilanen wird der Verbund zwischen Füllstoff und organischer Matrix erreicht. Dabei stellen die Si-OH-Gruppen die Verbindung zur Füllstoffoberfläche her und die ungesättigten Vinyl- oder Methacryl-Gruppen polymerisieren mit den Monomeren [Schmalz, 2005].

Das in der vorliegenden Arbeit geprüfte Komposit TetricEvoCeram (Ivoclar Vivadent) ist ein Nanofüllerkomposit mit einer mittleren Partikelgröße von 550nm [Ivoclar Vivadent, 2006].

Es besteht zu 82-83 Gewichtsprozent aus Füllkörpern wie Bariumglasfüller und Ytterbiumtrifluorid sowie zu 17-18 Gewichtsprozent aus BisGMA, UDMA und ethoxiliertem Bis-EMA. Darüber hinaus sind Additive, Katalysatoren, Stabilisatoren und weniger als 0,1 Gewichtsprozent Pigmente enthalten [Ivoclar Vivadent, 2006].

3.1.5.2 Silorankomposit (Filtek Siloran)

Silorane, die aus der Verbindung von Siloxan und Oxiranen entstehen, bilden als ringöffnende organische Moleküle die organische Matrix einer neuen Klasse von Kompositen. Der Unterschied zu konventionellen Kompositen auf Methacrylatbasis liegt in der Verwendung der Siloranmonomere und der damit verbundenen geringeren Polymerisationsschrumpfung [Weinmann *et al.*, 2005].

In dem Bemühen, die Polymerisationsschrumpfung bei Kompositen zu verringern, versuchte man zunächst durch Erhöhung des Füllstoffanteils eine Verringerung der Schrumpfung des gesamten Werkstoffes zu erzielen, wodurch jedoch nur kleine Verbesserungen erzielt werden konnten [Guggenberger *et al.*, 2007]. Doch dann erkannte man das Problem in der linearen Struktur der Kompositmonomere der

Harzmatrix, welche während der Polymerisation schrumpft [3M ESPE, 2006]. Komposite auf der Basis von Siloranen haben mit 0,94 Volumenprozent (bonded disk method) und 0,99 Volumenprozent (Archimedes method) eine deutlich geringere Volumenschrumpfung im Vergleich zu den Kompositen auf Methacrylatbasis [Weinmann *et al.*, 2005]. Silorane besitzen auch noch weitere mechanische und physikalische Vorteile wie eine geringere Wasseraufnahme und -löslichkeit, gute Biokompatibilität und geringe mutagene Eigenschaften sowie einen vergleichbaren E-Modul und auch ähnliche Biegefestigkeit [Palin *et al.*, 2005; Ilie *et al.*, 2006; Eick *et al.*, 2007].

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Filtek Siloran (3M ESPE) enthält zu 76 Gewichtsprozent anorganische Füllstoffe mit einer Partikelgröße zwischen 0,1 und 2 µm und wird wie alle dentalen Komposite mit einem speziellen Primer/Bonding-System an der Zahnhartsubstanz befestigt [3M ESPE, 2006].

3.1.5.3 Glasionomerzemente (Ketac Molar)

Glasionomerzemente (Polyalkenoatzemente, GIZ) werden heute nicht nur als Füllungsmaterialien verwendet, sondern eignen sich auch als Unterfüllungs- und Aufbauwerkstoff, sowie zur Wurzelkanalfüllung und zur Befestigung von Kronen und Brücken. Zusätzlich finden sie gelegentlich Anwendung als Fissurenversiegler [Schmalz, 2005].

Glasionomerzemente bestehen aus den Komponenten Pulver und Flüssigkeit, welche durch Säure-Basen-Reaktion aushärten [Craig *et al.*, 2006].

Bei den konventionellen Glasionomerzementen enthält der Pulveranteil Kalzium-Aluminium-Silikat-Glas mit eingesprengten kalziumfluoridreichen kristallisierten Tröpfchen. Der Flüssigkeitsanteil besteht dagegen aus Polyacrylsäuren und entmineralisiertem Wasser.

Die Abbindereaktion der GIZ ist eine Säure-Basen-Reaktion und verläuft in drei Schritten. Zunächst werden durch die Säure aus dem Silikatglas Kalzium- und später Aluminiumionen herausgelöst. Das nun entstandene Kalziumpolykarboxylatgel ist extrem empfindlich gegenüber Feuchtigkeit und Austrocknung. Deshalb muss auch später bei der Verarbeitung durch Bonding oder Matrizen ein Schutz erfolgen. Durch die erst nach Stunden einsetzende Einlagerung von Aluminiumionen in die Matrix

entsteht ein wasserunlösliches Kalzium-Aluminium-Karboxylat-Gel. Die endgültige Stabilisierung erfolgt über einen längeren Zeitraum durch die Einlagerung von Wasser [Nicholson, 1998; Hellwig *et al.*, 2006].

Kunststoffmodifizierte GIZ (Hybridionomere) enthalten neben dem beschriebenen Pulver/Flüssigkeitsgemisch zusätzliche Bestandteile, beispielsweise hydrophile Monomere (HEMA), Bis-GMA, Fotoakzeleratoren oder zusätzliche Methacrylatgruppen an den Polyacrylsäuremolekülen. Dadurch muss bei der Abbindung neben der Säure-Basen-Reaktion auch noch mittels lichtgesteuerter Polymerisation gehärtet werden. Glasionomerzemente können sowohl ionische als auch kovalente Bindungen an Zahnhartsubstanzen bilden [Guggenberger *et al.*, 1998; Smith, 1998; Hellwig *et al.*, 2006].

Indikationsgebiet für GIZ ist die reine zement- bzw. dentinbegrenzte Wurzeloberflächenkaries, aber auch Klasse-V-Kavitäten, deren zervikale Begrenzung im Wurzelzement bzw. Wurzelentin endet. Aufgrund ihrer Fluoridabgabe werden Glasionomerzemente hauptsächlich präventiv in der Zahnerhaltung eingesetzt, also im kariesaktiven Gebiss und in der Kinderzahnheilkunde. Auf diese Weise kann die Entstehung und die Progredienz von Sekundärkaries reduziert werden [Forsten, 1998; Hellwig *et al.*, 2006; Bürgers *et al.*, 2009].

3.1.5.4 Polymethylmethacrylat (PMMA)

Die in der Zahnheilkunde üblicherweise verwendeten Acrylate sind überwiegend Polymerisate von Abkömmlingen der Methacrylsäure. Das Polymethylmethacrylat (Polymethylmethacrylsäuremethylester, PMMA) wird in der Zahnheilkunde hauptsächlich zur Herstellung von Prothesen und kieferorthopädischen Apparaturen, aber auch als Beschichtungsmaterial für Gipsmodelle verwendet [Eichner *et al.*, 2000]. In der Medizin wird es unter anderem als Knochenzement für orthopädische Implantate eingesetzt und ist des weiteren aufgrund seiner hohen Stabilität und Lichtdurchlässigkeit ein geeignetes Material für intraoculäre Linsen [Gottenbos *et al.*, 2002]. Als Grundbaustein dieses Methacrylkunststoffes gilt der bei Raumtemperatur farblose Methylester der Methacrylsäure (MMA), welcher aufgrund seiner kurzen Kette mit 100,3°C einen relativ niedrigen Siedepunkt besitzt [Eichner *et al.*, 2000]. Die Dichte beträgt 0,935 g/cm³ und die Polymerisationsschrumpfung beim Übergang

von MMA zu PMMA etwa 25 Volumenprozent [Eichner *et al.*, 2000]. Der Übergang der einzelnen Bestandteile zum festen Kunststoff wird als Polyreaktion bezeichnet [Ludwig *et al.*, 2005]. Während der Polymerisation vereinigen sich ungesättigte Verbindungen (C=C Bindungen) unter Ausbildung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Einzelbindungen (C-C Bindung) zu kettenförmigen Makromolekülen [O'Brien, 2002; Craig *et al.*, 2006]. Eine Polymerisationsreaktion verläuft immer nach dem folgenden Reaktionsschema. Auf die Radikalbildung folgt der Start der Kettenbildung, danach wächst die Kette zu Polymeren und schließlich erfolgt ein Kettenabbruch. Radikale entstehen, indem einem Initiator-molekül Energie zugeführt wird. Dies kann beispielsweise durch Wärme, UV-Licht oder auch chemische Substanzen (Peroxide) erfolgen. Die Eigenschaften eines so gebildeten Kunststoffes hängen ab von Art und Verknüpfung der Monomere, sowie von der räumlichen Anordnung der gebildeten Makromoleküle und deren Wechselwirkungen [Eichner *et al.*, 1996].

3.1.5.5 Silikon (Mucopren)

Bei den Silikon-Abformmassen wird zwischen kondensationsvernetzenden („K- oder C-Silikon“) und additionsvernetzenden („A-Silikon“) Silikon unterschieden. Diese Zwei-Komponenten-Materialien bestehen entweder aus einer „Paste-Paste“- oder einer „Paste-Flüssigkeit“-Mischung [Eichner *et al.*, 2000].

Die Basispaste der K-Silikone besteht hauptsächlich aus Polydimethylsiloxanen (mit endständigen Hydroxylgruppen), Orthoalkylsilicaten zur Vernetzung und anorganischen Füllern. Eine Paste enthält üblicherweise 30-40% Füller, während man in sehr hoch viskösen Formen bis zu 75% Füller findet [O'Brien, 2002].

Der Reaktor enthält als Katalysator Zinnoctat oder Dibutylzinndilaurat. Weiterhin sind Lösungsmittel und Farbstoffe sowie bei Pasten noch zusätzlich Eindickmittel zugesetzt [O'Brien, 2002]. Mischt man die beiden Komponenten, kommt es zu einer Polykondensation, wobei Alkohol entsteht [Eichner *et al.*, 2000]. Während der Aufbewahrung des Abdrucks verdunstet der Alkohol und das Material kontrahiert und schrumpft. So kann ein K-Silikon während der Lagerung von 24 Stunden um 0,2-1,2% schrumpfen [Eichner *et al.*, 2000].

Die Basispaste der A-Silikone enthält ebenfalls Polysiloxane, jedoch mit endständigen Vinylgruppen, Hexachlorplatinsäure als Katalysator sowie Füll- und

Farbstoffe. Die Reaktorpaste besteht neben Organohydrogensiloxanen auch aus Füll- und Farbstoffen [Eichner *et al.*, 2000]. Nach dem Mischen reagieren die Vinylgruppen mit den Organohydrogensiloxanen durch Umlagerung der Bindung zu Polymeren. A-Silikone schrumpfen weniger als K-Silikone ($\leq 0,1$ nach 24 Stunden) und sind daher lagerstabiler und dimensionstreuer [Eichner *et al.*, 2000].

Die Füllstoffmenge der Basispaste bewirkt die Konsistenz dieser irreversibel-elastischen Abformmaterialien [O'Brien, 2002].

Silikone werden vor allem für die Hautpflege und in der plastischen Chirurgie verwendet, unter anderem auch für künstliche Herzklappen und Herzschrittmacher [Ratner *et al.*, 2004]. In der Zahnmedizin sind A- und K-Silikone für die exakte Abformung der Zähne zur Herstellung von Meister- und Präzisionsmodellen wichtig [O'Brien, 2002].

3.1.5.6 Cobalt-Chrom-Molybdän (Co₂₈Cr₆Mo)

CoCrMo-Legierungen finden in der Zahnheilkunde vor allem aufgrund ihres hohen E-Moduls ihre Anwendung, hauptsächlich innerhalb der Modellgussprothetik für die Herstellung von Einstückgussprothesen. In der Humanmedizin werden sie dagegen schon seit Jahrzehnten vor allem in der Unfallchirurgie und als Implantatwerkstoff, etwa in der Orthopädie, verwendet [Hildebrand *et al.*, 1989; Eichner *et al.*, 2000; Ratner *et al.*, 2004; Marxkors *et al.*, 2005; Reclaru *et al.*, 2005].

Durch die Eigenschaften der verschiedenen Legierungsbestandteile wird die Herstellung eines Werkstoffes mit großer Härte und Zugfestigkeit und vor allem Korrosionsbeständigkeit ermöglicht. Kobalt ist die Basis der Legierung und prägt daher ihre mechanischen Eigenschaften und trägt auch durch Oxidbildung zur Passivierung bei [Eichner *et al.*, 2000]. Durch die Ausbildung von Oxiden ist Chrom der wesentliche Bestandteil zur Verbesserung der Korrosionsbeständigkeit. Zur Sicherung der guten Biokompatibilität und Beständigkeit in der Mundhöhle muss der Chromanteil in den Kobaltlegierungen daher mindestens 25 Massenprozent betragen [Eichner *et al.*, 2000]. Nach der Erstarrung bilden Kobalt und Chrom bei hohen Temperaturen einen homogenen Mischkristall. Durch Zusatz von Molybdän wird das Gefüge stabilisiert, die Korrosionsbeständigkeit ebenfalls verbessert und eine Kontrolle des thermischen Ausdehnungskoeffizienten erzielt. Weitere Zusätze wie

Silizium und Kohlenstoff verbessern die Fließeigenschaften, steigern die Härte und erhöhen den Schmelzpunkt [Eichner *et al.*, 2000].

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Co28Cr6Mo-Legierung (Zimmer GmbH) mit einem Kohlenstoffgehalt von 0,2 Prozent wird besonders häufig als hoch beanspruchtes Verbindungselement in modularen Hüftprothesen verwendet. Sowohl im kalt- als auch im warmverformten Zustand weist es hohe Festigkeitswerte auf und besitzt einen hohen Verschleißwiderstand [Sulzer Medica/ Zimmer GmbH, 2001].

3.1.5.7 Titan (Ti6Al4V)

Der Werkstoff Titan hat sich in der Medizintechnik bewährt, wie etwa in der Osteosynthese oder als enossales Implantat [Cai *et al.*, 2003]. Darüber hinaus wird Titan auch in der Prothetik mittels spezieller Verarbeitungstechnologien (CAD/CAM, Gießen, Schweißen oder Verblendkeramiken) eingesetzt. Durch die Ausbildung einer Oxidschicht (TiO_2) ist Titan gegen Zersetzung durch Säuren weitgehend geschützt, dadurch korrosionsbeständig und daher auch biokompatibel [Nanci *et al.*, 1998; do Serro *et al.*, 1999; Eichner *et al.*, 2000].

Die Gewinnung von Titan basiert auf der Reduktion von Titan-tetrachlorid mit flüssigem Magnesium und der anschließenden Umschmelzung im Vakuumlichtbogenofen. Schließlich werden durch Kaltbereitung Drähte hergestellt [Eichner *et al.*, 2000].

Die mechanischen Eigenschaften des Titans werden durch Legierungszusätze unterschiedlicher Konzentration bestimmt. So verbessern beispielsweise geringfügige Zusätze von Aluminium, Vanadium, Mangan, Molybdän, Palladium und Zinn die mechanischen Eigenschaften und die Korrosionsbeständigkeit deutlich. Durch Zugabe von Sauerstoff nimmt die Härte und Bruchfestigkeit zu, während die Bruchdehnung und die Schlagzähigkeit abnehmen [Nanci *et al.*, 1998; Eichner *et al.*, 2000]. Der E-Modul von Titan liegt im Bereich von Edelmetalllegierungen, ist jedoch nur halb so hoch wie der für CoCr-Legierungen und begrenzt somit die Einsatzfähigkeit von Titan für den zahnärztlichen Modellguss [Nanci *et al.*, 1998; Eichner *et al.*, 2000].

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Ti6Al4V wird typischerweise als Osseosyntheseimplantatmaterial oder als Verankerungskomponente von Prothesen

benutzt. Es weist hohe mechanische Festigkeitswerte auf und ermöglicht die Osseointegration durch direktes Anwachsen des Knochens auf der aufgerauten Oberfläche [Sulzer Medica/ Zimmer GmbH, 2001].

3.1.5.8 Polytetrafluorethylen

Polytetrafluorethylen (PTFE) ist ein lineares, teilkristallines Polymer aus Kohlenstoff und Fluor und gehört zur Klasse der Polyhalogenolefine. PTFE ist ein Thermoplast, also ein hochmolekulares Fadenmolekül (Primärstruktur), welches weitgehend aus unvernetzten Monomeren aufgebaut und in Knäueln (Sekundärstruktur) angeordnet ist. Diese besitzen keinen Schmelzpunkt, sondern ein Schmelzintervall; oberhalb des Intervalls erfolgt die Zersetzung, unterhalb sind die Thermoplaste spröde und hart [Eichner *et al.*, 2000].

PTFE ist sehr reaktionsträge und widersteht selbst aggressiven Säuren. Der Grund dafür sind die besonders starken Bindungen zwischen den Kohlenstoff- und Fluoratomen. Wegen seiner extrem niedrigen Oberflächenspannung existieren nahezu keine Materialien oder Substanzen, die an Polytetrafluorethylen haften. Das extrem hydrophobe PTFE besitzt eine hohe Schmelztemperatur von 327°C [Ratner *et al.*, 2004]. In der Medizin wird PTFE für Implantate verwendet wie etwa Gefäßprothesen, arterielle Shunts, intravasculäre Geräte oder auch abdominelle Prothesen [Gottenbos *et al.*, 2002]. Dafür sprechen vor allem die lange Lebensdauer und die gute Verträglichkeit. Außerdem wird die Entstehung von Blutgerinnseln verringert [Ratner *et al.*, 2004]. Darüber hinaus ist PTFE auch in zahnmedizinischen Hygieneartikeln, beispielsweise Zahnseide, enthalten. Im täglichen Leben wird PTFE unter der Bezeichnung „Teflon“ als universelles Beschichtungsmaterial verwendet [Ludwig *et al.*, 2005].

3.1.5.9 Polyethylen

Das in der vorliegenden Arbeit getestete Polyethylen (PE) besteht nach Herstellerangaben aus Kalziumstearat-freiem, unter Kompression geformtem und maschinell gefertigtem UHMWPE (ultra high molecular weight polyethylene). Dieses

medizinische Material wird seit mehreren Jahren erfolgreich als artikulierender Oberflächenbestandteil von Gelenkprothesen eingesetzt. [Sulzer Medica/ Zimmer GmbH]. Polyethylen kommt in vier verschiedenen Dichten, als low density polyethylene (LDPE), als high density polyethylene (HDPE), als medium density polyethylene (MDPE) und als linear low density polyethylene (LLDPE) vor. Außerdem sind high density high molecular weight polyethylene (PE-HD-HMW) und high density ultra high molecular weight polyethylene (PE-HD-UHMW) verfügbar. Mit zunehmender Dichte steigt die Härte des Polyethylen und die Durchlässigkeit für Gase oder Flüssigkeiten sinkt [Ludwig *et al.*, 2005]. Im medizinischen Bereich wird Polyethylen unter anderem zur Herstellung von Implantaten verwendet wie beispielsweise Rückenmarksflüssigkeitsshunts oder orthopädische Prothesen [Gottenbos *et al.*, 2003]. Im zahnmedizinischen Bereich wird PE nur als Verpackungsmaterial verwendet [Ludwig *et al.*, 2005].

3.2. Methoden

3.2.1 Herstellung der Prüfkörper

Glasobjektträger wurden vorab mit 70%igem Ethanol gereinigt, mit Aqua demin. gespült und anschließend an der Luft getrocknet. Für die Herstellung der Prüfkörper selbst wurde neben Handschuhen und Instrumenten (Spatel, etc.) eine trockene, saubere und mit Tüchern abgedeckte Oberfläche benötigt.

3.2.1.1 Komposit (TetricEvoCeram)

Zunächst wurde in der Mitte des Glasobjektträgers ein Teflonring mit einem inneren Durchmesser von 11,3 mm, einer Wandstärke von 2 mm und einer Höhe von 2 mm platziert und anschließend mit TetricEvoCeram aus der 3g TEC-Spritze befüllt. Dazu wurde mit einem sauberen Skalpell ein etwa 8 mm langes Stück abgeschnitten und dieses mittels Spatel und Planstopfer flachgedrückt. Materialüberschüsse wurden entfernt. Nun wurde ein zweiter Objektträger auf den Teflonring gelegt und mit dem Daumen fest gegen diesen gedrückt. Dadurch wurde die Masse besser verteilt und

man erzielte eine glatte Prüfkörperoberfläche. Die Aushärtung des Materials erfolgte mit der Polymerisationslampe durch die Objektträger hindurch in einem Abstand von etwa 5 cm. Dabei wurde der Prüfkörper in der 12-, 16- und 20- Uhr- Position jeweils für 20 Sekunden gehärtet. Genau so wurde anschließend die Rückseite polymerisiert. Nach der Polymerisation und der Entfernung der Objektträger wurden die Prüfkörper aus dem Teflonring genommen.

Schließlich wurde der Prüfkörper für 7 Tage in einer 24-Wellplatte bei einer Temperatur von 25 °C in 2 ml Aqua demin. gelagert, um den Restmonomergehalt zu reduzieren.

3.2.1.2 Silorankomposit (Filtek Siloran)

In der Mitte eines Glasobjektträgers wurde ein Teflonring platziert und mit Silorankomposit aus der 3g Filtek Siloran Spritze befüllt. Dazu wurde mit einem sauberen Skalpell ein etwa 8 mm langes Stück abgeschnitten und mit einem Spatel und Planstopfer flachgedrückt. Materialüberschüsse wurden entfernt. Ein zweiter Objektträger wurde auf den Teflonring gelegt und mit dem Daumen fest gedrückt. Dadurch wurde die Masse besser verteilt und eine glatte Oberfläche des Prüfkörpers konnte erreicht werden. Die Aushärtung erfolgte mit der Polymerisationslampe durch die Objektträger hindurch in einem Abstand von 5 cm. Dabei wurde der Prüfkörper in der 12-, 16- und 20- Uhr- Position jeweils für 20 Sekunden gehärtet. Genau so wurde anschließend die Rückseite polymerisiert. Nach der Polymerisation wurden die Objektträger entfernt und der Prüfkörper wurde aus dem Teflonring genommen.

Schließlich wurde der Prüfkörper für 7 Tage in einer 24-Wellplatte bei einer Temperatur von 25 °C in 2 ml Aqua demin. gelagert, um den Restmonomergehalt zu reduzieren.

3.2.1.3 Glasionomerezemente (Ketac Molar)

Es wurde wieder ein Teflonring in der Mitte des Glasobjektträgers platziert. Ketac Molar muss, bevor es verwendet werden kann, gebrauchsfertig gemacht werden. Hierzu wurde als erstes das Ketac-Aplicap (Ketac-Mischkapsel) mit einem speziellen

Aktivator (3M ESPE) aktiviert, wobei dieser für 2 Sekunden nach unten gedrückt wurde. Anschließend wurde das Ketac-Aplicap für 10 Sekunden mit dem Vivadent Silamat geschüttelt und konnte schlussendlich mit dem Ketac Aplicator in den Teflonring gebracht werden. Benötigt wurden dabei jeweils 2 Ketac-Mischkapseln pro Teflonring, deshalb musste darauf geachtet werden, dass diese gleichzeitig angemischt werden. Beim Applizieren wurde versucht, mit der Aplicap-Spitze im Material zu bleiben, um Lufteinschlüsse in den Prüfkörpern zu vermeiden.

Auch das zweite Ketac-Aplicap wurde auf dieselbe Weise „angemischt“ und in den Teflonring eingebracht. Dabei wurde die Ketac-Prüfkörper-Oberfläche mit einem Spatel geglättet. Nun wurde auch hier ein zweiter Objektträger auf den Teflonring gelegt und für 30 Sekunden angedrückt. Der Prüfkörper wurde anschließend zwischen den beiden Objektträgern für 7 Minuten gehärtet. Danach wurden die Objektträger entfernt, und der Prüfkörper wurde vorsichtig aus dem Teflonring genommen. Zuletzt wurde der Ketac-Molar-Prüfkörper für 24 Stunden bei einer Temperatur von 25 °C in einer feuchten Kammer gelagert. Als Kammer fungierte ein Kunststoffbehälter mit einem feuchten Tuch auf dessen Boden. Auf diesem Tuch befand sich ein kleines Eisengitter, welches den direkten Kontakt der Prüfkörper mit dem feuchten Tuch verhinderte.

Diese feuchte Kammer wurde wegen des Abbindeverhaltens konventioneller Glasionomerezemente verwendet. Wie bereits beschrieben, ist das Kalzium-polykarboxylatgel extrem empfindlich gegenüber Feuchtigkeit und Austrocknung. Die erst nach Stunden einsetzende Einlagerung von Aluminiumionen in die Matrix ließ ein wasserunlösliches Kalzium-Aluminium-Karboxylat-Gel entstehen. Die endgültige Stabilisierung erfolgte über einen längeren Zeitraum durch die Einlagerung von Wasser, die durch die feuchte Kammer erreicht wurde.

3.2.1.4 Polymethylmethacrylat (PMMA)

Der Prothesenkunststoff PMMA war zunächst ein Pulver-Flüssigkeits-Gemisch. Dabei sollten Polymer (Pulver) und Monomer (Flüssigkeit) im Verhältnis 3:1 gemischt werden. In einem geeigneten Gummibecker wurden mit einem Spatel 7 ml Flüssigkeit mit so viel Pulver vermischt, dass sich eine klare, dünnflüssige Masse ergab. Mehrere Glasobjektträger mit Teflonring wurden vorbereitet und mit einem

kleinen Löffel der angemischte Kunststoff in die Teflonringe eingefüllt. Die Prüfkörper wurden anschließend in einen 55°C heißen Drucktopf gelegt und bei einem Druck von 2,5 bar für 15 Minuten polymerisiert. Wegen der guten Fließfähigkeit des PMMA war ein zweiter Objektträger nicht nötig, da dadurch Lufteinschlüsse vermieden wurden und eine glatte Oberfläche ermöglicht wurde.

Nun wurden die Objektträger wieder entfernt und die Prüfkörper vorsichtig aus dem Teflonring genommen. Die Prüfkörper wurden dann für 24 Stunden in einer 24-Wellplatte bei einer Temperatur von 25°C in je 2 ml Aqua demin. gelagert, um den Restmonomergehalt zu reduzieren.

3.2.1.5 Silikon (Mucopren)

In der Mitte eines Glasobjektträgers wurde ein Teflonring platziert und mit Silikon (Mucopren soft) befüllt. Dazu wurde mit einer Mischpistole das Silikon in den Teflonring eingebracht. Das Silikon Mucopren soft lag als Basis- und Katalysatorpaste in speziellen Kartuschen vor und wurde durch die Verwendung einer Mischpistole vermischt. Aufgrund seiner fließfähigen Konsistenz ließ es sich gut und gleichmäßig im Ring verteilen. Um Lufteinschlüsse zu verhindern, sollte wie mit Ketac Molar auch mit Mucopren soft die Spitze der Mischkanüle beim Applizieren möglichst im Material verbleiben. Ein zweiter Objektträger wurde auch hier nicht benötigt.

Der Prüfkörper war aufgrund seiner plastischen Stabilität unbegrenzt haltbar und musste nicht speziell gelagert werden.

3.2.1.6 Cobalt-Chrom-Molybdän (Co₂₈Cr₆Mo) / Titan (Ti6Al4V)

Prüfkörper der Metalle Titan und Cobalt-Chrom-Molybdän wurden von der Firma Zimmer GmbH (Winterthur, Schweiz) hergestellt. Zunächst wurden von den unterschiedlichen Materialien Stangen mit 11,3 mm Durchmesser gefertigt und anschließend von diesen 1,5 mm - 2 mm dicke Prüfkörperscheiben abgeschnitten.

3.2.1.7 Polytetrafluorethylen (PTFE)

Prüfkörper aus Polytetrafluorethylen (PTFE) wurden von der Werkstatt Chemie der Universität Regensburg hergestellt. Das PTFE wurde zunächst in Stangen mit 11,3 mm Durchmesser gefertigt und von diesen Stangen wurden dann mittels einer Spitze kleine Scheibchen mit 1,5 mm - 2 mm Dicke heruntergedreht.

3.2.1.8 Polyethylen (PE)

Prüfkörper aus Polyethylen (PE) wurden wieder von der Firma Zimmer GmbH (Winterthur, Schweiz) hergestellt. Auch hier wurden zunächst PE-Stangen mit 11,3 mm Durchmesser gefertigt und von diesen Stangen wurden dann ebenfalls 1,5 mm - 2 mm dicke Prüfkörperscheibchen herunterschnitten.

3.2.2 Eigenfluoreszenz von Werkstoffoberflächen

In der vorliegenden Arbeit sollte als Nachweis der Adhäsion von *S. gordonii* auf den sehr kleinen Oberflächen der verschiedenen Werkstoffe Fluoreszenzfärbung der Bakterien versucht werden. Dazu sollte zunächst die Eigenfluoreszenz von Prüfkörpern der Werkstoffe getestet werden. Für die Werkstoffe Ketac Molar und Filtek Siloran Silorankomposit wurde jedoch eine sehr hohe Eigenfluoreszenz ermittelt (Abb. 1). Damit war eine Quantifizierung adhärenter und fluoreszenzgefärbter Bakterien auf diesen Oberflächen nicht möglich. Alternativ dazu wurde die Nachweismethode mittels ECL (enhanced chemiluminescence) gewählt.

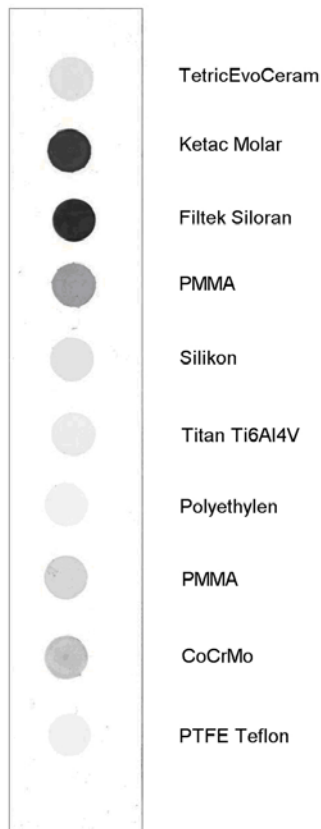


Abbildung 1: Eigenfluoreszenz von Prüfkörpern der verschiedenen Werkstoffe. Die extreme Schwärzung der Prüfkörper der Werkstoffe Ketac Molar und Siloran (Filtek Siloran, Komposit) zeigt ihre starke Eigenfluoreszenz.

3.2.3 Nachweisreaktion von Bakterien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode zum Nachweis von Bakterien mittels Biotin/Avidin wurde von Müller und Ruhl entwickelt [Müller *et al.*, 2007]. Sie dient dem quantitativen Nachweis von Bakterien auf sehr kleinen Oberflächen. Damit kann die Adhäsion weniger Bakterien direkt auf kleinen Oberflächen quantifiziert werden.

Wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt, bindet das Sulfo-NHS-Biotin unter Spaltung einer Esterbindung kovalent an eine freie Aminogruppe auf der Oberfläche eines Bakteriums. Avidin D/ Avidin-D-HRP (horseradish peroxidase) erkennt seinerseits das Biotin und bindet an dieses. Die Meerrettichperoxidase (HRP) oxidiert dann den Farbstoff Luminol, ein Bestandteil des ECL, der dann blaues Licht emittiert (Chemiluminiszenz). Durch Belichtung eines Röntgenfilms wird die Adhäsion von

Bakterien auf Prüfkörpern in ein sichtbares und über eine Eichkurve quantifizierbares Ergebnis überführt [Ruhl *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2007].

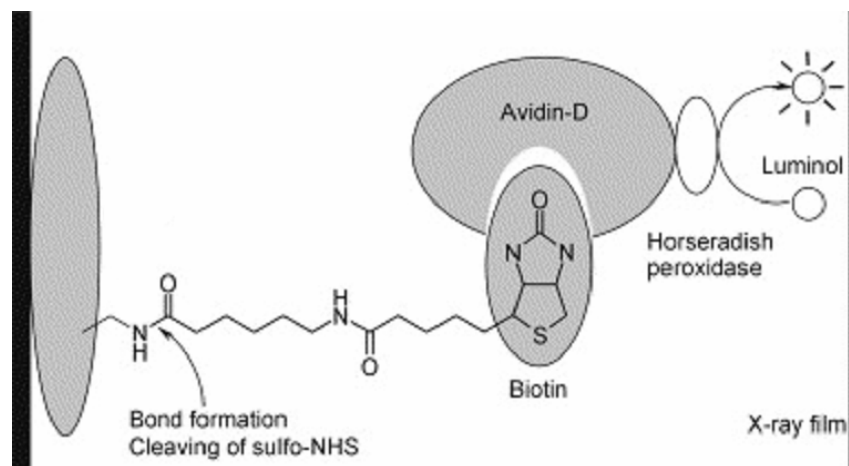


Abbildung 2: Veranschaulichung der Biotin-Avidin-Reaktion; modifiziert nach Ruhl *et al.*, 2006

3.2.4 Speichel

Der in den Versuchen verwendete humane Speichel wird hauptsächlich von den drei großen paarig angelegten Speicheldrüsen (*glandula parotis*, *glandula sublingualis*, *glandula submandibularis*) gebildet [Kielbassa, 2006; Walz *et al.*, 2006].

Die Speichelproduktion der Probanden (24 Jahre/männlich und 29 Jahre/männlich) wurde mithilfe von Paraffin Pellets von Ivoclar angeregt. Der Speichel wurde mit einem Glasfaserfilter vorfiltriert, bis auf eine Porengröße von 0,2 µm mit einem Speichelfilter (Pall Acrodisc 32 mm Syringe Filter, PALL Life Sciences, Porengröße: 1,2 µm, 0,45 µm, 0,2 µm Supor Membrane) steril filtriert und schließlich bei -20°C in Falcon-Röhrchen tiefgefroren (Bestimmung der Konzentration des Speichelpools: 0,609 mg/ml).

3.2.5 Herstellung von Glycerinkulturen mit *S. gordonii*

Sämtliche Experimente zur Adhäsion von *S. gordonii* auf Werkstoffen sollten mit einer identischen Bakterienpopulation durchgeführt werden. Dazu wurden Gefrierkulturen in ausreichender Zahl angelegt. Zunächst wurde eine 500 µl Glycerinkultur von *S. gordonii* DL1 in 40 ml Nährmedium (50 ml Falcon-Röhrchen) unter sterilen Bedingungen in der Werkbank pipettiert. Das Röhrchen wurde dann bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

Danach wurde bei 3700 U/min (Umdrehungen pro Minute) für 7 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden unter sterilen Bedingungen in der Werkbank 10 ml Glycerin mit 87% Glyceringehalt hinzugefügt, gemischt und schließlich je 500 µl Gefrierkulturen angelegt. Diese wurden bei -20°C im Labor bis zur weiteren Verwendung in den Experimenten gelagert.

Darüber hinaus wurde ein 3-Ösenausstrich auf einem Frischblut-Agar angelegt und dieser bei 37°C im Brutschrank bis zum nächsten Tag aufbewahrt. Dadurch wurde die Reinkultur des Bakterienstamms kontrolliert.

3.2.6 Keimzahlbestimmung von *S. gordonii*

Für die Analyse der Adhäsion von Bakterien auf den Oberflächen der verschiedenen Werkstoffe war aufgrund früherer Experimente als Ausgangssuspension eine Bakterienkonzentration von $1,0 \times 10^8$ KBE (Kolonien bildende Einheiten) pro ml wünschenswert (Prof. Schweikl, persönliche Mitteilung). Aus praktischen Gründen sollte diese Konzentration für jedes Experiment anhand der optischen Dichte einer Bakteriensuspension ermittelt werden. Bisher durfte man aus früheren Untersuchungen annehmen, dass eine optische Dichte (OD) von 1,2 ($\lambda = 600$ nm) einer Bakterienkonzentration von $1,0 \times 10^8$ KBE/ml entspricht. Dieses Verhältnis sollte jedoch für die hier durchzuführenden Experimente nochmals überprüft werden.

Dazu wurde wie oben beschrieben eine Gefrierkultur von *S. gordonii* über Nacht in Kultur genommen (vgl. Kapitel 3.2.5). Dann wurde diese Bakterienkultur bei 3700 U/min für insgesamt 7 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde zweimal mit sterilem NaCl (0,9%) gewaschen. Dabei wurde das

Zellpellet in 40 ml NaCl mit Hilfe des Vortex-Vibrationsschüttlers resuspendiert, wieder zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das jetzt mediumfreie Zellpellet wurde in 40 ml NaCl aufgenommen, und diese Suspension wurde auf eine optische Dichte (OD) von 1,2 bei 600 nm eingestellt. Danach wurden von zwei verschiedenen Kulturen jeweils Verdünnungsreihen von 1:50000, 1:100000 und 1:200000 hergestellt. Aus jeder Verdünnung wurden dreimal je 100 µl auf je drei Frischblut-Agar-Platten ausplattiert und für 2 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Zahl der Kolonien auf den Agarplatten bestimmt.

3.2.7 Minifold für Bakterienstandards

3.2.7.1 Vorbereitung der Standardlösung

Vorbereitend wurde am Vortag eine 500 µl Gefrierkultur von *S. gordonii* wie oben beschrieben über Nacht in Kultur genommen. Nun wurde als erstes der Arbeitsplatz mit Küchentüchern ausgelegt, um eine saubere Arbeitsfläche zu erhalten. Dann wurde die Bakterienkultur bei 3700 U/min für insgesamt 7 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Dazu wurden je 40 ml PBS mit dem Zellpellet mit Hilfe des Vortex-Vibrationsschüttlers vermischt, wieder zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Danach wurden die jetzt mediumfreien Bakterien in 40 ml PBS-Puffer und 200 µl Biotin in DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert (4 mg Biotin für 200 µl Lösung für 40 ml).

Das Biotin, welches vorher in Milligramm-Aliquots in Eppendorfcups abgewogen wurde, wurde aus dem -20°C kalten Gefrierschrank genommen und mit DMSO vermischt. Die Biotinmenge in jedem Cup wurde mit 50 multipliziert, um so die benötigte Menge an Dimethylsulfoxid zu erhalten. Die so errechnete Menge wurde in das Cup pipettiert, gründlich mittels Vortex-Vibrationsschüttler vermischt und kurz abzentrifugiert, um eventuelle Reste im Deckel zu beseitigen. Dann wurden daraus 200 µl Lösung entnommen, zu den Bakterien pipettiert und diese für 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Die Bakteriensuspension wurde dann wieder dreimal mit PBS-Puffer gewaschen, um alle freien Biotinmoleküle zu entfernen. Abschließend wurde das Zellpellet wieder in

40 ml PBS resuspendiert. Die gewünschte Keimzahl wurde mittels optischer Dichte bei 600 Nanometer im Photometer eingestellt. Bei diesem Versuch wurden 0,48 OD benötigt, die einer Bakterienkonzentration von $4,0 \times 10^7$ KBE/ml entsprechen.

3.2.7.2 Standardgewinnung

Für die spätere Quantifizierung der auf den Oberflächen der verschiedenen Werkstoffen adhären Bakterien wurde für jedes Experiment eine Eichkurve mit bekannten Zahlen von *S. gordonii* erstellt (vgl. Kapitel 3.2.8.2).

Zunächst wurde der Arbeitsplatz für ein sauberes Arbeiten mit Küchentüchern ausgelegt. Danach wurde die Nitrozellulosemembran und ein Filterpapier in Fotoschalen mit PBS eingeweicht. Dann wurde eine Verdünnungsreihe (1:2) der Bakterienkultur in PBS pipettiert. Dazu wurden elf Falcon-Röhrchen mit je 20 ml PBS vorbereitet. Aus der zuvor hergestellten Bakteriensuspension ($4,0 \times 10^7$ KBE/ml) mit 40ml Gesamtvolumen wurden 20 ml in das erste von elf Falcon-Röhrchen pipettiert und gründlich mit Hilfe des Vortex-Vibrationsschüttlers vermischt. Nun wurden aus diesem Gemisch ebenfalls 20 ml in das zweite der elf Falcon-Röhrchen pipettiert; dieser Vorgang wurde bis zum 11. Röhrchen wiederholt, wobei die am Ende des Pipettierens verbleibenden 20 ml Bakteriensuspension in der Pipette verworfen wurden. Also befanden sich in Röhrchen 1 20 ml Bakteriensuspension der Konzentration $4,0 \times 10^7$ KBE/ml, in Röhrchen 2 20 ml der Konzentration $2,0 \times 10^7$ KBE/ml usw. Nun wurde der Inhalt der zwölf Falcon-Röhrchen auf je ein Plastikschälchen verteilt und außerdem wurde ein Schälchen mit beliebiger PBS-Menge vorbereitet. Als nächstes wurde die Minifold-Apparatur zusammengebaut. Hierbei wurden die O-Ringe in die Probenbehälterplatte eingesetzt und die Filterträgerplatte auf die Vakuumkammer aufgesetzt. Auf die Filterträgerplatte wurden dann das in PBS eingeweichte Blotting-Paper sowie die ebenfalls eingeweichte Nitrozellulosemembran gelegt. Nun wurden die Probenbehälterplatte und der Vacublottahmen aufgesetzt und die Apparatur über Kreuz verschlossen. Anschließend wurde die Minifold-Apparatur an die Vakuumpumpe angeschlossen und diese eingeschaltet. Nun wurden alle 96 Wells des Minifolds mit einer Mehrfachpipette mit je 100 µl PBS einmal gespült. Zuletzt wurden die Bakteriensuspensionen (Verdünnungen) aus den verschiedenen Plastikschälchen

auf den Minifold übertragen und je 200 µl davon durchgesaugt. Dabei kam in Reihe 1 mit acht Wells die Bakteriensuspension aus dem ersten Schälchen und in jede weitere Reihe aus dem entsprechenden Schälchen. Das Nachspülen des Minifolds mit je 100 µl PBS pro Well diente vor allem dazu, an den Rändern der Minifold-Wells verbleibende Tropfen der durchgesaugten Bakteriensuspension zu entfernen.

Die Minifold-Apparatur wurde nun vorsichtig auseinandergebaut, der Vacublott-rahmen wieder über Kreuz geöffnet und die Membran mit dem Bakterienstandard auf einem Filterpapier an der Luft getrocknet. Die Membran wurde dann mit einem sauberen Skalpell in kleinere Segmente geschnitten und sorgfältig aufbewahrt, um dann in das jeweilige Experiment eingebracht zu werden. Die Membran ermöglichte durch ihre klaren Unterschiede in der Zahl der Bakterien und den entsprechenden Graustufen auf den belichteten Filmen (siehe unten) später eine gute Quantifizierung der Bakterien auf den Prüfkörpern. Die durch den Minifold gesaugte Lösung (Bakterien- und PBS-Lösung) wurde in eine Flasche gefüllt und autoklaviert. Die O-Ringe der Probenbehälterplatte wurden von dieser entfernt und zusammen mit einem Rührfisch in ein mit Spülmittelwasser gefülltes Becherglas gegeben und gerührt. Dann wurden die O-Ringe in ein Sieb gegeben, gründlich mit Wasser gespült, auf ein fusselfreies Tuch gelegt und so getrocknet. Die restlichen Teile des Minifolds wurden ebenfalls mit Spülmittelwasser gereinigt und mit Wasser demin. nachgespült; Probenbehälterplatte und Filterträgerplatte wurden anschließend mit Druckluft getrocknet.

3.2.8 Bakterielle Adhäsion auf verschiedenen Werkstoffen und auf Nitro-zellulosemembran

3.2.8.1 Probenvorbereitung

Wegen der industriellen Herstellung und der damit verbundenen Politur der Titan- und CoCrMo- Prüfkörper wurden diese vor dem eigentlichen Experiment entfettet und von Schmierschichten befreit.

Dazu wurden die Metall-Prüfkörper in folgenden Lösungen in dieser Reihenfolge für je 3 Minuten im Ultraschallbad gewaschen: Aceton, Toloul, Aceton, Ethanol und demineralisiertes Wasser. Nach der Schallung mit Wasser war auf keiner

Prüfkörpergruppe noch Säure mit dem pH-Indikatorpapier nachweisbar. Aufgrund ihrer geringen Säurestabilität wurden Prüfkörper aller anderen Werkstoffe nur in Ethanol und Wasser geschallt mit Ausnahme von Ketac Molar, welches wegen seiner geringen Stabilität nicht weiter vorbehandelt wurde.

3.2.8.2 Bakterielle Adhäsion

Bakterienkultur

Mit den so vorbereiteten Prüfkörpern wurde das eigentliche Experiment gestartet. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf zwölf verwendete Prüfkörper (acht mit bakterieller Adhäsion und vier Leerwerte) pro Versuch.

Zunächst wurde am Vortag wieder wie schon oben beschrieben der Bakterienstamm in Kultur genommen. Die Bakterienkultur wurde bei 3700 U/min für insgesamt 7 Minuten zentrifugiert, das überschüssige Medium verworfen und das Zellpellet wurde dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Dazu wurden je 40 ml PBS mit den verbliebenen Bakterien mit Hilfe des Vortex-Vibrationsschüttlers vermischt, wieder zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Schließlich wurde das mediumfreie Bakterienpellet in 40 ml PBS-Puffer und 200 µl Biotin in DMSO resuspendiert.

Die Biotinlösung wurde wie oben (vgl. Kapitel 3.2.7.1) beschrieben hergestellt und die Bakteriensuspension wurde damit 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Bakteriensuspension wurde danach wieder dreimal mit PBS-Puffer gewaschen, um die freien Biotinmoleküle zu entfernen. Das Zellpellet wurde wieder in 40 ml PBS resuspendiert und die gewünschte Keimzahl mittels optischer Dichte bei 600 Nanometer im Photometer gemessen und eingestellt. Für die Adhäsionsexperimente wurden 1,2 OD benötigt, die einer Bakterienkonzentration von $1,0 \times 10^8$ KBE/ml entsprechen (vgl. Kapitel 3.2.6).

Beschichten der Prüfkörper mit Speichel

Parallel dazu wurden je zwölf Prüfkörper mit humanem Speichel (vl. Kapitel 3.2.4) oder mit PBS-Puffer inkubiert. Dazu wurden zwei 24-Wellplatten auf den Orbitalschüttler gestellt. In die ersten drei Reihen einer 24-Wellplatte wurden je 1,2 ml Speichel oder PBS pipettiert. Die verbliebenen neun Reihen der zwei Platten wurden mit je 850 µl PBS-Puffer gefüllt.

Nun wurden die Prüfkörper in die Wellplatte gesetzt und im Speichel oder PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Orbitalschüttler auf 60 U/min eingestellt und die Prüfkörper mit der Pinzette dreimal nach jeweils 5 Minuten eine Wellreihe weiter gesetzt und in PBS gewaschen. Danach wurden zwei verschiedene Reihen an 24-Wellplatten bereitgestellt. Die eine für acht Prüfkörper für die Adhäsion der Bakterien und die andere für die vier Leerwerte. Für beide Reihen wurden jeweils andere Pinzetten verwendet, um so die Werte nicht zu verfälschen.

Inkubation der Prüfkörper mit S. gordonii

Aus der mit Biotin inkubierten Bakteriensuspension (1,2 OD) wurden je 2 ml auf die ersten zwei Reihen der ersten Wellplatte pipettiert. Dann wurden die Prüfkörper in diese weitergesetzt und für 1 Stunde in der Biotinlösung im Kühlschrank belassen. Während dieser Stunde wurden nun folgende Waschgänge vorbereitet, die dazu dienen, die nicht gebundenen Biotinbestandteile wieder von den Prüfkörpern zu entfernen. Alle zwölf Prüfkörper wurden nun dreimal in je 850 µl TBS/Tween20 gewaschen. Die Lösungen wurden in die nächsten Wellreihen pipettiert und die Prüfkörper nach jeweils 5 Minuten weitergesetzt.

Nach dem 15 Minuten dauernden Waschvorgang wurden die Prüfkörper nun in eine Avidin/TBS/Tween20-Lösung gelegt. Das Avidin erkennt die Biotinmoleküle und bindet überall dort, wo vorher das Biotin gebunden hat. Das Avidin musste nun aus Avidin D und Horseradish Peroxidase Avidin D im Verhältnis 1:7 angemischt werden, da die Ergebnisse des Experiments mittels Belichtung eines Films gewonnen wurden. Die Vermischung ist notwendig, da das ECL (Luminol und Enhancer) nur die Peroxidase oxidiert und somit ohne Avidin D die Lichtreaktion zu intensiv ausfallen würde. Es wurde nun also eine 0,1%ige Avidin/TBS/Tween20-Lösung in einem Becherglas mit Hilfe eines Rührfisches hergestellt. Davon wurden je 2 ml auf die Wellplatten verteilt, die Prüfkörper weitergesetzt und für 30 Minuten darin belassen.

Auch der zuvor hergestellte Bakterienstandard (vgl. Kapitel 3.2.7) kam ab diesem Zeitpunkt in den Versuch. Zunächst wurde dieser kurz in 20 ml TBS/Tween20 in einer Fotoschale eingeweicht und anschließend auch für 30 Minuten in der hergestellten 0,1%igen Avidin/TBS/Tween20-Lösung belassen.

Zuletzt erfolgten noch einmal zwei unterschiedliche Waschgänge, zunächst mit 850 µl TBS/Tween20 und danach mit 850 µl TBS normal je Well für die Prüfkörper sowie mit 60 ml TBS/Tween20 und danach mit 60 ml TBS normal je Fotoschale für

den Standard. Es wurde jeweils viermal 5 Minuten in TBS/Tween20 und zweimal in TBS normal gewaschen. Auch hier wurde der Orbitalschüttler auf 60 U/min gestellt wie schon bei den Waschgängen zuvor.

Am Ende wurden die Prüfkörper und der Standard aus dem TBS normal genommen und in eine neue Wellplatte bzw. Fotoschale umgesetzt, in die zuvor auch je 850 µl bzw. 60 ml TBS normal pipettiert wurden. Der Deckel der Wellplatte wurde darauf gesetzt und das Ganze mit Parafilm umschlossen, um so die Prüfkörper und den Standard auf ihrem Transport zu schützen. Anschließend wurden die Prüfkörper und der Bakterienstandard in die Dunkelkammer zum Belichten transportiert.

3.2.9 Nachweis von *S. gordonii* auf Prüfkörpern und Nitrozellulosemembranen

3.2.9.1 Benötigte Materialien

Für den Nachweis der Bakterien auf den Prüfkörpern und in der Standardreihe auf der Nitrozellulosemembran mit ECL wurden diese Materialien und Gerätschaften benötigt: Filmkassette, Doppelklebeband, zwei Kopierfolien, Filterpapier, Cellophan, drei 5-ml-Pipetten, zwei 2-ml-Pipetten, eine elektrische Pipette, ein Wecker, eine Pinzette, ein Standardschälchen, ein Falconröhrchen in einem Halter, eine Fotoschale, ECL (Solution 1 und 2), Röntgenfilme, (zwölf) Prüfkörper und die Standardverdünnungsreihe auf der Nitrozellulosemembran.

3.2.9.2 Vorbereitung im Labor

Als erstes wurde auf der Innenseite der Filmkassette eine Kopierfolie mit Klebeband befestigt, so dass diese nicht verschiebbare Unterfläche die später einzubringende ECL-Lösung am unkontrollierten Ausbreiten hindert. Wegen der Größe des später einzulegenden Röntgenfilms sollten die Prüfkörper möglichst eng und wegen der glatten Oberfläche auch rutschfest platziert werden. Dazu wurden auf die Kopierfolie drei Streifen doppelseitiges Klebeband geklebt, auf welchen die Prüfkörper später platziert wurden. Diese Anordnung wurde mit einer weiteren Klarsichtfolie abgedeckt, die an einem Ende mit Klebeband fixiert wurde, so dass ein aufklappbares

„Sandwich“ entstand. In diese wurden später die Prüfkörper und die Membran eingebracht (Abb. 3). Nach dieser Vorbereitung der Filmkassette wurde ein Stück Cellophan ausgeschnitten, welches in seiner Größe später genau die Prüfkörper bedecken sollte. Später wurde dieses Cellophan 2 Minuten mit ECL inkubiert und danach passgenau auf die Prüfkörper gelegt. Für die benötigte Menge an ECL wurden die Flächen der Nitrozellulosemembran und des Cellophanstücks berechnet und jeweils mit 0,125 ml/ cm² (Herstellerangabe) multipliziert. Für die zwölf Prüfkörper mit einer Fläche von je 1 cm² ergab sich eine immer feste Gesamtmenge von 1,5 ml ECL (12 cm² x 0,125 ml/ cm²). Die einzelnen Volumina wurden addiert und notiert.

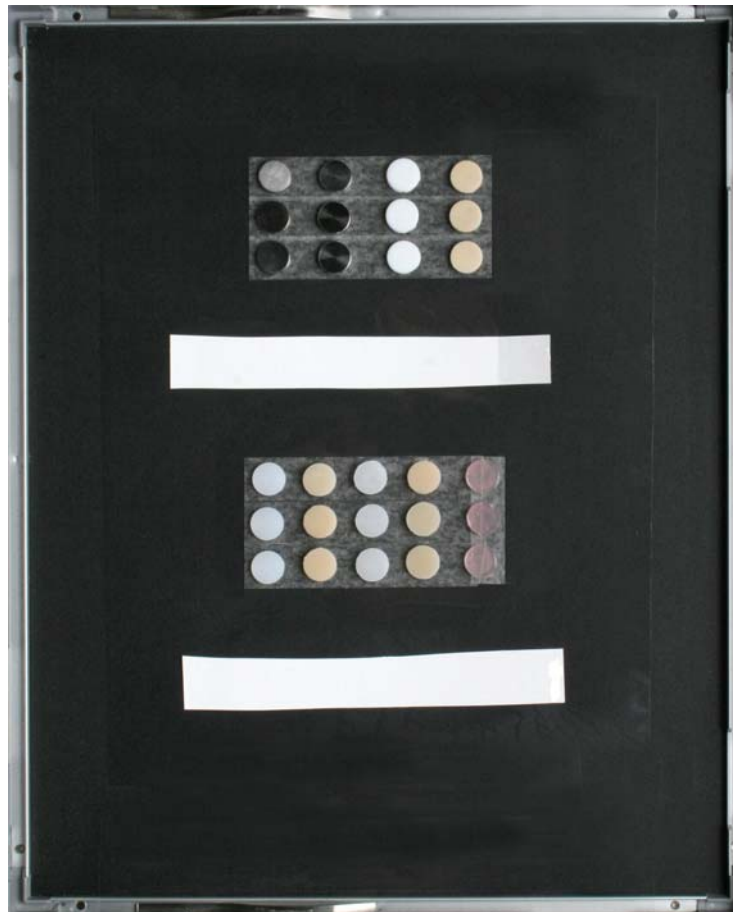


Abbildung 3: Die Anordnung von Prüfkörpern zum Nachweis adhärenter Bakterien. In einer Filmkassette sind jeweils drei Prüfkörper von neun verschiedenen Werkstoffen fixiert. Die rechteckigen Streifen tragen jeweils Standardverdünnungsreihen von *S. gordonii* auf Nitrozellulosemembran.

3.2.9.3 Durchführung des Nachweises in der Dunkelkammer

Die Nachweisreaktion mit ECL wurde in der Dunkelkammer unter Rotlicht und bei geschlossener Tür durchgeführt. Vor Beginn wurde kontrolliert, ob genügend Entwicklerflüssigkeit, destilliertes Wasser und Fixierlösung vorhanden ist. Erst dann wurde das ECL aus Solution1 und Solution2 im Verhältnis 1:1 angemischt. Dazu wurden mit zwei separaten 5-ml-Pipetten jeweils die vorgegebenen Mengen in ein Falcon-Röhrchen pipettiert und geschüttelt. Nun wurde mit einer neuen Pipette die vorher errechnete Menge an ECL entnommen und das sich in einer kleinen Box befindende Cellophan überschichtet. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit der Standardverdünnungsreihe aus der mit TBS gefüllten Fotoschale genommen, kurz abgetropft und mit der bakterienfreien Rückseite nach unten auf ein Filterpapier gelegt. Der Standard wurde dann in ein extra hergestelltes Schälchen gelegt und mit der errechneten Menge an ECL für 2 Minuten inkubiert. Nun wurden die Prüfkörper aus der mit TBS gefüllten 24-Wellplatte genommen, kurz mit der Unterseite auf dem Filterpapier abgelegt und anschließend wie die Membran mit der mit Bakterien belegten Seite nach oben auf dem Doppelklebeband der aufgeklappten Filmkassette platziert. Dabei bildete jede Materialgruppe eine Reihe aus drei Prüfkörpern, wobei die Leerwerte die unterste Reihe bildeten. Dann wurden mit Hilfe der 2-ml-Pipette insgesamt 1,5 ml ECL auf die Prüfkörper gegeben und das mit ECL inkubierte Cellophanstück ohne Luftblasen genau darüber platziert. Nach 2 Minuten wurde die Nitrozellulosemembran aus dem Schälchen genommen, kurz mit der Rückseite auf dem Filterpapier abgestreift und unter den Prüfkörpern auf die erste Folie gelegt. Nun wurde das Sandwich wieder geschlossen, also die zweite Folie auf die Prüfkörper und die Membran gelegt und kurz glattgestrichen. Die Aufgabe des Sandwichs bestand darin, den direkten Kontakt von ECL und Röntgenfilm zu verhindern.

Danach wurde ein Röntgenfilm mit einem Knick in der rechten oberen Ecke markiert, um so später die Vorderseite zu erkennen, und dann für genau 10 Sekunden in die Filmkassette gelegt und diese geschlossen. Danach wurde die Kassette geöffnet und der nun belichtete Film wurde in die Entwicklerlösung gesteckt. Dieser Vorgang wurde dann mit drei weiteren Filmen wiederholt, die jedoch 20, 30 oder 60 Sekunden belichtet wurden (Abb. 4). Die so entstandenen Filme bilden Bakterien auf Prüfkörpern und in Standardverdünnungsreihen als Grauwerte ab, die nun nach definiert verschiedenen langen Belichtungszeiten unterschiedlich intensiv erzeugt

wurden. Ein Sättigungseffekt in der Belichtung des Röntgenfilms sollte mit den unterschiedlichen Belichtungszeiten erkennbar werden. Aus diesen Grauwerten zu unterschiedlichen Belichtungszeiten wurde die Zahl der Bakterien auf den Prüfkörpern errechnet (vgl. Kapitel 3.2.10).

3.2.10 Quantifizierung der Adhäsion von *S. gordonii*

Der belichtete Film (Abb. 4) mit Grauwerten für zwölf unterschiedlich stark gefärbte Prüfkörper (acht mit Bakterienadhäsion und vier Leerwerte) und für einen Bakterienstandard mit einer Ausgangskonzentration von üblicherweise 0,48 OD, also $4,0 \times 10^7$ KBE/ml, wurde zunächst gescannt und dann mit einem speziellen Computerprogramm (Optimas, Version 6.1; Optimas Co. Bothell, WA, USA) ausgewertet.

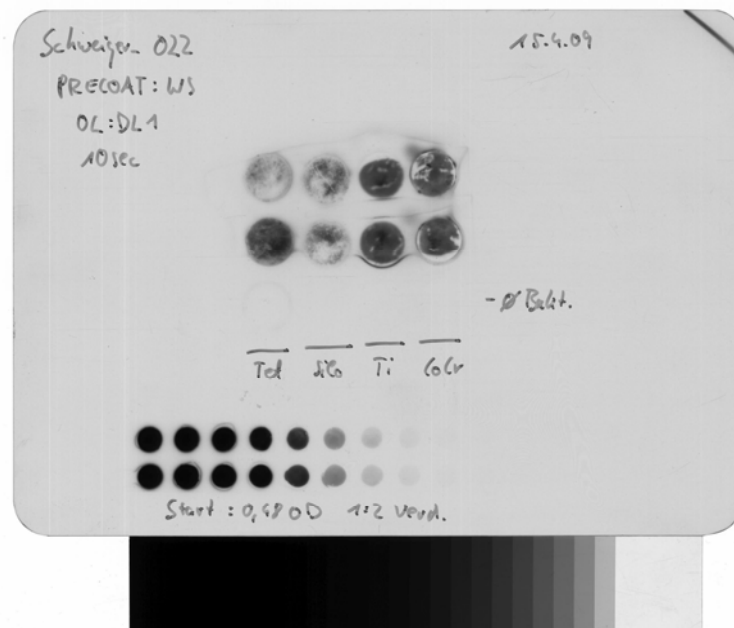


Abbildung 4: Quantifizierung der Adhäsion von *S. gordonii*. Die Abbildung zeigt beispielhaft einen belichteten Film zur Bestimmung der Menge adhärenter Bakterien auf Biomaterialien. In der oberen Hälfte erkennt man in unterschiedlichen Graustufen die detektierten Bakterienmengen auf jeweils zwei Prüfkörpern der Biomaterialien Tetric Evo Ceram (Tet), Filtek Siloran (Silo), Titan (Ti) und CoCrMo (CoCr). Darunter jeweils Prüfkörper, die nicht mit einer Bakteriensuspension inkubiert wurden (Leerwerte). Wie oben links zu sehen ist, wurden die Prüfkörper mit Speichel beschichtet und der Film wurde für 10 Sekunden lang belichtet. Die untere Hälfte zeigt Graustufen, die Bakterienmengen auf der Nitrozellulosemembran (Standardverdünnungsreihe) entsprechen und durch das bereits beschriebene entsprechende Trennen der Membran jeweils doppelt angezeigt werden. Die höchste hier aufgetragene Bakterienmenge von 4×10^7 ergibt die höchste Schwärzung (links), mit steigenden Verdünnungsschritten von 1:2 werden die Grauwerte (nach rechts) schwächer. Unterhalb des Films kann man zur Kalibrierung des Scanners eine Schwarz-Weiß-Tabelle erkennen, mit deren Hilfe die Filme immer gleichbleibend grau eingescannt werden können.

Mit Hilfe dieses Programms ist es möglich, die von den Prüfkörpern erzeugten unterschiedlichen Lumineszenzgrade über die Schwärzung der entsprechenden Standards zu bestimmen. Die jeweiligen Grauwerte der verschiedenen Prüfkörper und der Bakterienstandards wurden über eine definierte Kreisgröße integriert und eingelesen. Für die Bestimmung der Grauwerte der Prüfkörper wurde hierbei stets die gleiche Kreisgröße von 2,15 (spezifische Skalierung des Programms) angelegt. Die Graustufen des jeweiligen Standards wurden mit einer kleineren Kreisgröße von 1,0 ausgewertet. Die Kreisgrößen wurden kleiner als der Durchmesser der Spots gewählt, um die gelegentlich auftretenden Randeffekte auszuschließen. Mittels des Programms TableCurve wurden aus den Grauwerten der Standardverdünnungsreihen Eichkurven erstellt. Jeder Bakterienzahl (Abszisse) in dieser Eichkurve entspricht exakt ein Grauwert (Ordinate) (vgl. Kapitel 4.4.1). Die Zahl der Bakterien in 200 µl Bakteriensuspension (vgl. Kapitel 3.2.7.2) wurde in KBE/mm² umgerechnet: $\text{KBE/mm}^2 = \text{KBE} \times 0,2 \text{ mm} / 19,6 \text{ mm}^2$. Aus den Grauwerten für die Prüfkörper wurden dann mit den Werten der Eichkurve die entsprechenden Bakterienmengen errechnet. Diese Daten wurden in einer Excel-Tabelle gespeichert.

3.2.11 Netzwinkelbestimmung

Die Netzwinkelbestimmung der einzelnen Materialien erfolgte in der Abteilung Chemie der Universität Regensburg. Netzwinkel gegen Wasser beschreiben die Hydrophilie einer Oberfläche. Werkstoffoberflächen, die einen Netzwinkel gegen Wasser von 0° bis etwa 63° bilden, werden üblicherweise als hydrophil und solche mit Netzwinkeln von etwa 63° bis 120° als hydrophob definiert [Vogler, 1998].

Zunächst wurden von jeder der neun Materialgruppen zwei Prüfkörper wie oben beschrieben hergestellt und vorbereitet (Entfernung etwaiger Monomer- und Fettrückstände). Nun wurde je ein Prüfkörper mit 1,2 ml humanem Speichel oder PBS für 30 Minuten beschichtet, anschließend zweimal je 5 Minuten mit 850 µl PBS gewaschen und schließlich mit demineralisiertem Wasser gespült. Die Prüfkörper wurden dann über Nacht im Exsikator (geschlossenes Becherglas mit Membranpumpe) getrocknet.

Danach wurde der jeweilige Prüfkörper auf den Objektträger des Winkelmessgeräts gelegt [Name: P1 Goniometer, Firma: Erna Inc. (Tokio, Japan)], mit einer dünnen

Nadel ein definierter Tropfen Wasser auf der Oberfläche platziert und dann der Netzwinkel über ein individuell angelegtes Fadenkreuz durch die Lupe links und rechts abgelesen (siehe auch Abb. 5).

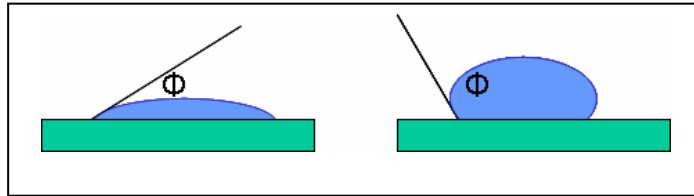


Abbildung 5: Darstellung der Netzwinkelmessung bei hydrophiler (links) und hydrophober (rechts) Materialoberfläche (grün) gegen einen Wassertropfen (blau); Φ = Netzwinkel.

3.2.12 Rasterelektronenmikroskopie

Die Adhäsion von *S. gordonii* auf Oberflächen wurde für die Werkstoffe Polytetrafluorethylen und Silikon mittels Rasterelektronenmikroskopie visualisiert. Mehrere Prüfkörper der Werkstoffe wurden wie oben beschrieben hergestellt, vorbehandelt, mit PBS beschichtet und mit einer Bakteriensuspension ($4,0 \times 10^7$ KBE/ml) inkubiert. Die Oberflächen wurden danach mit einem FEI Quanta 400F (Eindhoven, Holland) Rasterelektronenmikroskop im Hochvakuum-Modus in unterschiedlich hoher Auflösung dargestellt.

3.2.13 Statistik

Die Netzwinkel gegen Wasser der mit PBS oder humanem Speichel beschichteten Oberflächen von Prüfkörpern wurden für jedes Material je zweimal mit jeweils drei Prüfkörpern gemessen. Die resultierenden zwölf Einzelwerte wurden zu Medianwerten und Perzentilen (25% und 75%) zusammengefasst.

Bei der Keimzahlbestimmung für *S. gordonii* DL1 wurden jeweils drei Frischblut-Agars für jede Konzentration zweimal ausplattiert und ausgezählt und anschließend der entsprechende Medianwert gebildet.

Für die Bestimmung der Zahl der Bakterien auf den unterschiedlichen Biomaterialien wurden jeweils zehn Prüfkörper mit PBS oder humanem Speichel (WS = whole

saliva) beschichtet. Die Zahl der Bakterien wurde durch die Avidin/Biotin-Reaktion (vgl. Kapitel 3.2.3) sichtbar gemacht und über eine Standarddeichkurve mit Hilfe der Graustufenauslesung mit Optimas und TableCurve berechnet. Die in der Regel zehn Einzelwerte wurden zu Medianen und Perzentilen (25% und 75%) zusammengefasst. Mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests (SPSS Version 15.0, SPSS, Chicago, IL, USA) wurden Unterschiede zwischen den Medianen durch paarweises Vergleichen von Werten auf der 0,05 Signifikanzebene untersucht.

Für Korrelationsanalysen mittels SigmaPlot (SigmaPlot 8.0, Systat Software, San Jose, CA, USA) zur Abhängigkeit der Adhäsion von *S. gordonii* DL1 von Netzwinkeln auf den verschiedenen Materialien oder den adsorbierten Proteinmengen aus humanem Speichel wurden ebenfalls Medianwerte herangezogen. Die Daten für die Proteinmengen wurden mit Erlaubnis (Prof. Dr. H. Schweikl) aus der Doktorarbeit von Herrn Dr. U. Carl übernommen, die parallel zur vorliegenden Arbeit entstand (Carl, 2010).

Die statistische Analyse sämtlicher Daten sowie ihre grafische Darstellung (SigmaPlot 8.0) erfolgte durch Herrn Dr. K.-A. Hiller (Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Universitätsklinikum der Universität Regensburg).

4. Ergebnisse

4.1 Die Bestimmung von Netzwinkeln

Die Bestimmung der Netzwinkel auf den Oberflächen der verschiedenen Biomaterialien sollte eine Einschätzung ihrer Hydrophobizität ermöglichen. Dieser physikochemische Parameter sollte großen Einfluss auf die Adhäsion von Bakterien an Werkstoffoberflächen haben [Hannig und Hannig, 2009]. Für die geprüften Materialien wurden nach der Beschichtung mit PBS Netzwinkelwerte zwischen 30° (Glasionomerzement Ketac Molar) und 120° (Polytetrafluorethylen PTFE) gefunden.

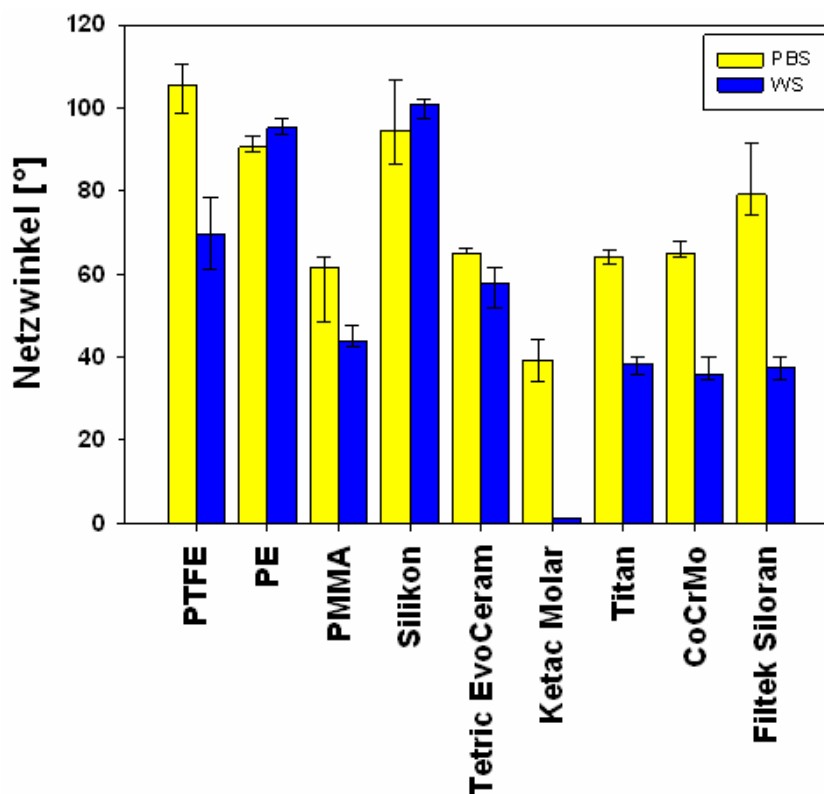


Abbildung 6: Netzwinkel der Oberflächen von Biomaterialien mit Wasser. Die Oberflächen wurden mit PBS (phosphate buffered saline) (gelbe Balken) oder humanem Speichel (WS= whole saliva) (blaue Balken) beschichtet. Die Grafik zeigt Mediane (plus 25% und 75% Perzentile) aus insgesamt 12 Einzelwerten (n=12). PTFE = Polytetrafluorethylen; PE= Polyethylen; PMMA = Polymethylmethacrylat; Silikon (Mucopren soft); TetricEvoCeram (Komposit); Ketac Molar (Glasionomerzement); Titan (TiAl4V6); CoCrMo= Cobalt-Chrom-Molybdän (Co28Cr6Mo); Siloran = Filtek Siloran. Das Ergebnis der statistischen Analyse der Unterschiede zwischen den Medianen der Bakterienzahlen ist in Tabelle 1 gezeigt.

Nach einer Unterteilung dieser beachtlichen Spannbreite wurden die Materialien mit Netzwinkeln zwischen 90,5° und 105,5° nach Beschichtung mit PBS als stark hydrophob (PTFE, PE und Silikon) und solche mit Netzwinkeln zwischen 61,75° (PMMA) und 79,25° (Filtek Siloran) als schwach hydrophob (PMMA, Filtek Siloran, TetricEvoCeram, Titan und CoCrMo) eingestuft. Der Glasionomerzement (Ketac Molar) mit einem Netzwinkel von 39,25° wurde auf der Basis von Literaturdaten als hydrophil klassifiziert [Vogler, 1998].

Die Beschichtung mit humanem Speichel hatte für einige der hier geprüften Oberflächen eine Reduktion des Netzwinkels und damit eine Steigerung der Hydrophilie zur Folge (Abb. 6). Besonders deutlich war der Wechsel der Netzwinkel für Titan auf 38,5°, für CoCrMo auf 35,75° und für Filtek Siloran auf 37,5°, denn damit sind diese zunächst hydrophoben Oberflächen nun als hydrophil einzustufen. So wurde auch die Oberfläche von PMMA (43,75°) hydrophil, während PTFE auch nach der Beschichtung mit humanem Speichel mit einem Netzwinkel von 69,75° eine hydrophobe Oberfläche blieb und auch die Netzwinkel von PE, Silikon und TetricEvoCeram blieben unverändert hoch. Auf der Oberfläche des Glasionomerzements Ketac Molar war nach der Beschichtung mit humanem Speichel ein Netzwinkel nicht mehr messbar.

Tabelle 1: Statistische Analyse der Netzwinkel auf den Materialien bei Beschichtung mit Speichel (WS = whole saliva) und PBS;
PTFE = Polytetrafluorethylen; PE= Polyethylen; PMMA = Polymethylmethacrylat; Silikon (Mucopren soft); TetricEvoCeram (Komposit); Ketac Molar (Glasionomerzement); Titan (TiAl4V6); CoCrMo= Cobalt-Chrom-Molybdän (Co28Cr6Mo); Siloran = Filtek Siloran. In der Diagonalen (grau hinterlegt) sind die p-Werte der Beschichtungen PBS vs. WS gegeneinander dargestellt (NS = nicht signifikant; $p \leq 0,05$).

WS/PBS	Teflon	PE	PMMA	Silikon	TEC	GIZ	Titan	CoCrMo	Siloran	
PTFE	0,002	0,002	0,002	0,002	0,026	0,002	0,002	0,002	0,002	
PE	0,004	0,015	0,002	0,015	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	
PMMA	0,002	0,002	0,009	0,002	0,002	0,002	0,015	0,002	0,026	
Silikon	NS	NS	0,002	NS	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	
TetricEvoCeram	0,002	0,002	0,009	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	WS
Ketac Molar	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	
Titan	0,002	0,002	0,041	0,002	NS	0,002	0,002	NS	NS	
CoCrMo	0,002	0,002	NS	0,002	NS	0,002	NS	0,002	NS	
Siloran	0,041	NS	0,002	NS	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	
					PBS					WS/PBS

4.2 Bakterienadhäsion auf Biomaterialien

4.2.1 Bakterienstandardkurven

Die Standardverdünnungsreihen mit bekannten Zahlen an *S. gordonii* wurden als Grauwerte von Dots nach der Detektion der biotinylierten Bakterien mit Avidin und Chemilumineszenz auf einer Nitrozellulosemembran sichtbar gemacht (Abb. 7). Die Grauwerte (Signale) der hergestellten Bakterienstandards wurden mittels Scanner und der Software Optimas ermittelt und schließlich mit TableCurve dargestellt (vgl. Kapitel 3.2.7.2, 3.2.9 und 3.2.10). Die Dots im rechten Bereich der Verdünnungsreihe der Bakterien auf der Nitrozellulosemembran erzeugten als hohe Zelldichten (4×10^5 KBE/mm²) eine sehr starke Schwärzung. Diese nahm mit abnehmender Bakterienzahl (1:2 Verdünnung pro Feld) auf der Zellulosemembran in Richtung des linken Bereichs kontinuierlich ab. Der Zusammenhang zwischen den Grauwerten und den eingesetzten Bakterienzahlen ist in einer Eichkurve gezeigt. In jedem einzelnen Experiment zur Bestimmung der Bakterien-Menge auf Biomaterialien wurde eine entsprechende Eichkurve erstellt.

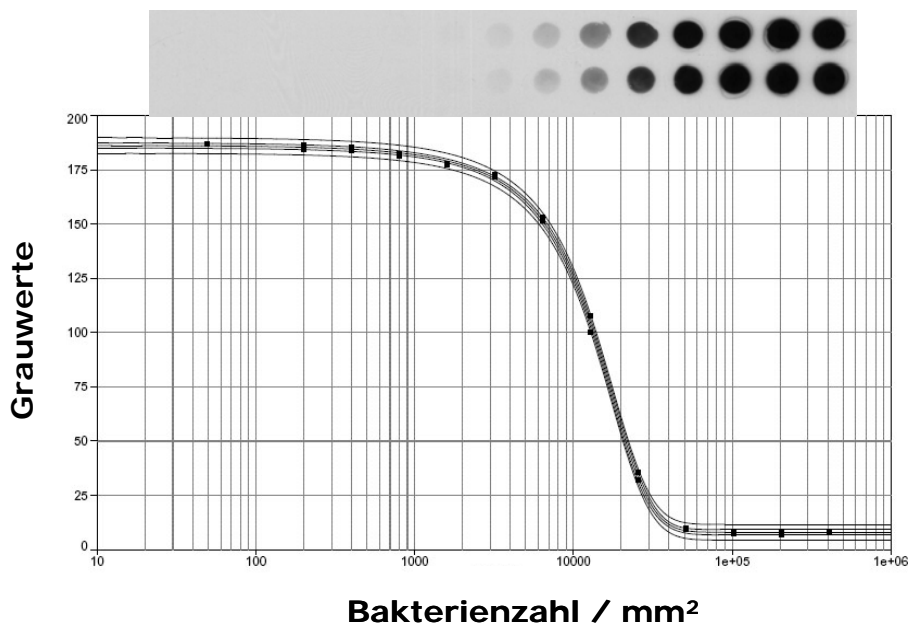


Abbildung 7: Darstellung eines Bakterienstandards mit Eichkurve. Die als unterschiedliche Grauwerte detektierten Bakterienmengen einer seriellen Verdünnungsreihe auf einer Nitrozellulosemembran (oben) sind in der Grafik (unten) quantifiziert und gefittet. In der Standardkurve (mit 95% Konfidenzintervallen) ist auf der x-Achse die jeweilige geblottete Bakterienzahl gegen die Graufärbung (Greylevel-Mean) auf der y-Achse aufgetragen.

4.2.2 Bakterienadhäsion an Biomaterialien

Die Zusammenfassung der Daten aus wiederholten Experimenten zeigt, dass *S. gordonii* in unterschiedlichen Zellzahlen an den verschiedenen Biomaterialien adhärierte (Abb. 8). Selbst für ein identisches Material gab es Unterschiede in Abhängigkeit von der Beschichtung mit PBS oder humanem Speichel (WS = whole saliva). Dabei wurden die höchsten Zellzahlen mit etwa $3,2 \times 10^4$ KBE/mm² auf Ketac Molar nach einer Beschichtung mit Speichel gemessen, die niedrigsten Zellzahlen wurden mit etwa 4×10^3 KBE/mm² auf Filtek Siloran mit PBS-Beschichtung gefunden (Abb. 8). Auffällig ist, dass mit Speichel als Beschichtung der Materialoberflächen verglichen mit PBS eine leichte Erhöhung der Adhäsion der Bakterien auf den Materialien Teflon, Polyethylen, PMMA, Silikon, TetricEvoCeram und Ketac Molar zu beobachten war. Allerdings waren die Unterschiede für diese Materialien nicht signifikant (vgl. Tabelle 2). Auf Filtek Siloran dagegen wurden nach der Beschichtung mit humanem Speichel mit etwa $1,6 \times 10^4$ KBE/mm² signifikant mehr Bakterien ermittelt als mit 4×10^3 KBE/mm² bei der Beschichtung mit PBS. Auch auf den metallischen Prüfkörpern waren die Unterschiede der Bakterienzahlen abhängig von der Beschichtung signifikant, hier wurden allerdings auf den mit Speichel beschichteten Oberflächen weniger Bakterien gefunden als auf den mit PBS vorbehandelten Materialien (vgl. Tabelle 2). Mitunter ließen sich starke Schwankungen in der Bakterienadhäsion feststellen, vor allem auf Polyethylen und Ketac Molar nach der Beschichtung mit Speichel sowie auf PMMA nach der Beschichtung mit PBS. Dramatisch waren diese Schwankungen auf Polyethylen, zwischen maximal 6×10^4 KBE/mm² und minimal $2,2 \times 10^4$ KBE/mm².

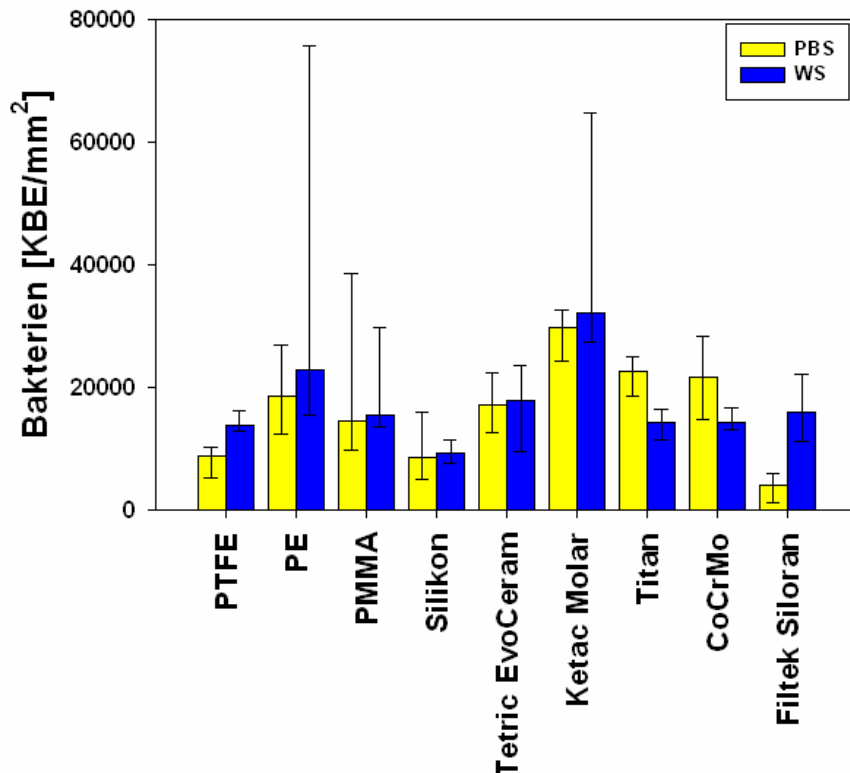


Abbildung 8: Die Adhäsion von *S. gordonii* auf Oberflächen von Biomaterialien. Die Oberflächen wurden mit Speichel (WS = whole saliva) und PBS beschichtet. Die Grafik zeigt Mediane (plus 25% und 75% Perzentile) aus insgesamt 10 Einzelwerten (n = 10). PTFE = Polytetrafluorethylen; PE= Polyethylen; PMMA = Polymethylmethacrylat; Silikon (Mucopren soft); TetricEvoCeram (Komposit); Ketac Molar (Glasionomerzement); Titan (TiAl4V6); CoCrMo= Cobalt-Chrom-Molybdän (Co28Cr6Mo); Siloran = Filtek Siloran. Das Ergebnis der statistischen Analyse der Unterschiede zwischen den Medianen der Bakterienzahlen ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2: Statistische Analyse der Bakterienmengen auf den Materialien bei Beschichtung mit Speichel (WS = whole saliva) und PBS;

PTFE = Polytetrafluorethylen; PE= Polyethylen; PMMA = Polymethylmethacrylat; Silikon (Mucopren soft); TetricEvoCeram (Komposit); Ketac Molar (Glasionomerzement); Titan (TiAl4V6); CoCrMo= Cobalt-Chrom-Molybdän (Co28Cr6Mo); Siloran = Filtek Siloran. In der Diagonalen (grau hinterlegt) sind die p-Werte der Beschichtungen PBS vs. WS gegeneinander dargestellt (NS = nicht signifikant; $p \leq 0,05$).

WS/PBS	Teflon	PE	PMMA	Silikon	TEC	GIZ	Titan	CoCrMo	Siloran	WS
PTFE	0	0,034	NS	0,003	NS	0	NS	NS	NS	WS
PE	0,007	NS	NS	0,001	NS	NS	0,016	0,034	0,038	
PMMA	0,022	NS	NS	0,009	NS	0,02	NS	NS	NS	
Silikon	NS	[0.056]	NS	NS	[0.059]	0,001	0,005	0,002	0,008	
TetricEvoCeram	0,003	NS	NS	NS	NS	0	NS	NS	NS	
Ketac Molar	0	0,016	NS	0	0,001	NS	0	0	0	
Titan	0	NS	NS	0	NS	0,003	0,005	NS	NS	
CoCrMo	0	NS	NS	0,002	NS	0,011	NS	0,015	NS	
Siloran	[0.052]	0,003	0,016	0,035	0,013	0	0	0	0,001	
PBS										WS/PBS

4.2.3 Korrelationsanalysen

Zur Darstellung der Abhängigkeit der Adhäsion von *S. gordonii* DL1 von der Hydrophobizität beschichteter oder unbeschichteter Werkstoffoberflächen und von der Menge adsorbierter Proteine wurden lineare Regressionsanalysen errechnet. Die Analyse zwischen steigenden Netzwinkeln auf Werkstoffoberflächen ohne Beschichtung mit humanem Speichel und adhärenen *S. gordonii* DL1 lässt eine negative Korrelation dieser beiden Parameter erkennen. Auf einer sehr hydrophilen Oberfläche wurden mit etwa 3×10^4 KBE/mm² die meisten Zellen gefunden, während etwa 1×10^4 KBE/mm² auf hydrophoben Oberflächen nachgewiesen wurden. Die Unterschiede zwischen den Zellzahlen auf den Oberflächen sind somit über einen weiten Bereich der Hydrophobizität klein und die negative Steigung der Regressionsgeraden ist entsprechend gering (Abb. 9).

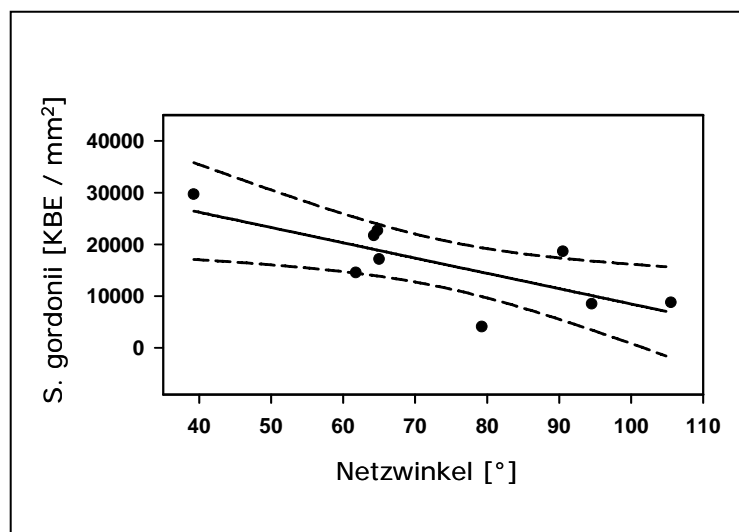


Abbildung 9: Korrelationsanalyse der Zahl adhärenender *S. gordonii* in Abhängigkeit von Netzwinkeln unbeschichteter Materialien. Linearer Fit (Gerade) von Medianen mit 95% Konfidenzlimiten; die Mediane sind als Punkte dargestellt.
 $y = a + bx$: $y = 38055 - 295.71851x$; $r^2 = 0.55565$.

Anders als für unbeschichtete Oberflächen war auf den mit humanem Speichel beschichteten Oberflächen dieser negative Zusammenhang zwischen steigenden Netzwinkeln und der Zahl der Mikroorganismen nicht nachzuweisen. Die Zahl der Zellen blieb über einen weiten Bereich der Benetzbarkeit mit Wasser gleich hoch und

damit unabhängig von den jeweiligen Netzwinkeln (Abb. 10). Derselbe Zusammenhang wurde zwischen der Zahl der Zellen und der auf den Oberflächen detektierten Proteinmengen gefunden. Die Proteinmenge des Speichels per se hatte keinen Einfluss auf die Zahl adhärenter Zellen des Stammes *S. gordonii* DL1 (Abb. 11).

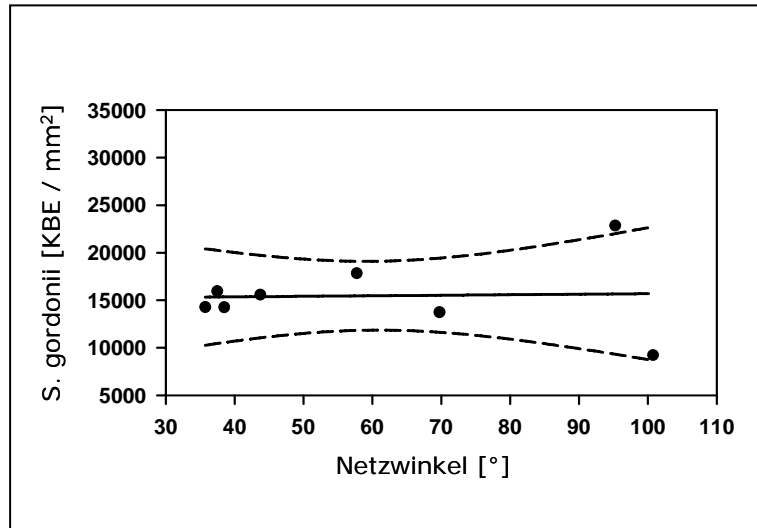


Abbildung 10: Korrelationsanalyse der Zahl adhätierender *S. gordonii* in Abhängigkeit von Netzwinkeln der Materialien nach Beschichtung mit humanem Speichel. Linearer Fit (Gerade) von Medianen mit 95% Konfidenzlimiten; die Mediane sind als Punkte dargestellt.
 $y = a + bx$: $y = 15134.858 + 5.4982405 x$; $r^2 = 0.0013862$.

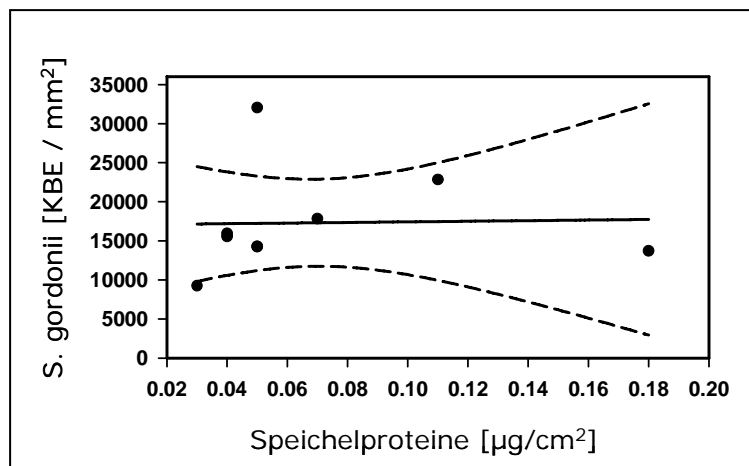


Abbildung 11: Korrelationsanalyse der Zahl adhätierender *S. gordonii* in Abhängigkeit von der Speichelproteinmenge auf den Materialien. Linearer Fit (Gerade) von Medianen mit 95% Konfidenzlimiten; die Mediane sind als Punkte dargestellt.
 $y = a + bx$: $y = 17039.524 + 3886.1671x$; $r^2 = 0.00078961553$.

4.3 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen beispielhaft die Adhäsion von *S. gordonii* auf Polytetrafluorethylen und Silikon nach Behandlung mit PBS. Auf beiden Materialien erkennt man in der geringeren Vergrößerung die gleichmäßige Verteilung der Bakterien über die gesamte Oberfläche. In der höheren Vergrößerung werden die unterschiedlichen Kettenlängen der Streptokokken deutlich erkennbar, die von einzelnen Zellen bis zu etwa 20 Zellen in einer Reihe reichen. Außerdem lässt sich auch die Oberflächenbeschaffenheit der Prüfkörper beurteilen. So erkennt man bei den maschinell hergestellten PTFE-Prüfkörpern beispielsweise Schneidespuren des Herstellungsvorgangs, während die manuell hergestellten Silikonprüfkörper eine relativ glatte Oberfläche aufweisen (Abb. 12 und 13).

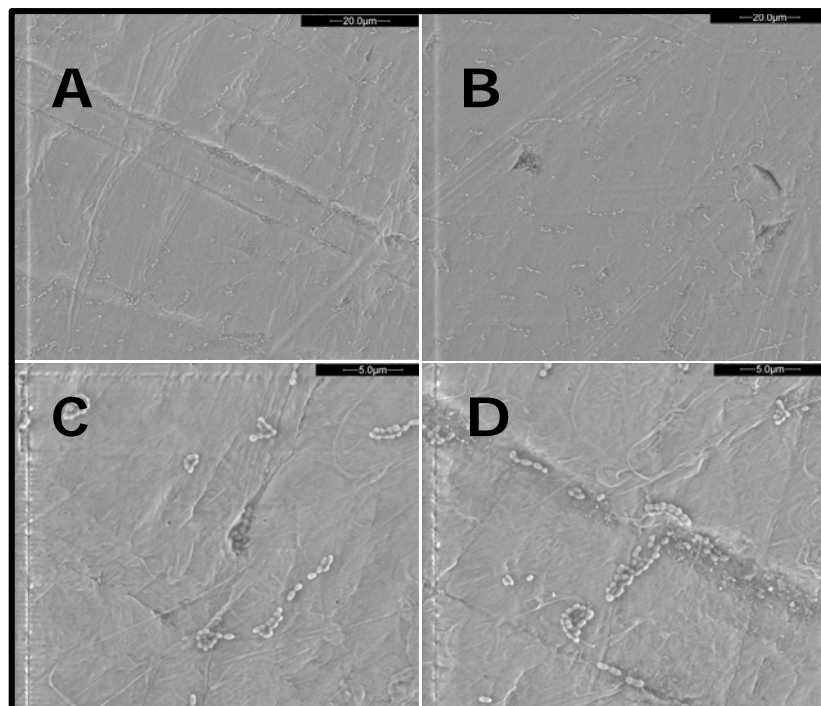


Abbildung 12: *S. gordonii* auf PTFE. Die elektronenmikroskopische Aufnahme (REM) zeigt die gleichmäßige Verteilung in zwei Bereichen (A,B) auf dieser Oberfläche. Die höhere Auflösung (C,D) zeigt in zwei verschiedenen Bereichen die Struktur der Oberfläche und adhärente Bakterien.

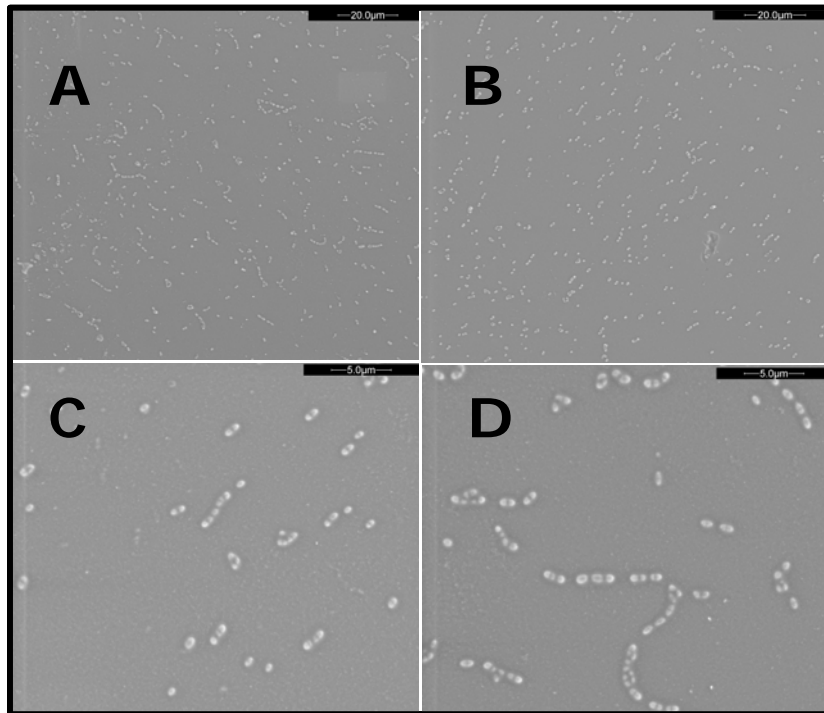


Abbildung 13: *S. gordonii* auf Silikon. Die elektronenmikroskopische Aufnahme (REM) zeigt die gleichmäßige Verteilung in zwei Bereichen (A,B) auf dieser Oberfläche. Die höhere Auflösung (C,D) zeigt in zwei verschiedenen Bereichen die Struktur der Oberfläche und adhärenente Bakterien.

5. Diskussion

5.1 Prinzipien der Adhäsion oraler Biomoleküle

Bioadhäsion, die Akkumulation von Proteinen, Bakterien oder eukaryontischen Zellen in einer Flüssigkeit auf einer festen Oberfläche, ist ein sehr komplexes Geschehen und von vielen Faktoren abhängig. Dabei sind physikalische Kräfte zwischen natürlichen und artifiziellen Oberflächen und der biologischen Umgebung die Grundlage für sämtliche Adhäsionsvorgänge. Die Art der chemischen Elemente, die chemische Funktionalität (Gruppen), die elektrische Ladung, Rauigkeit oder die Benetzbarkeit mit Wasser erzeugen Oberflächen, die ihrerseits die Zusammensetzung und Struktur einer Elektrolytlösung in unmittelbarer Nachbarschaft zu festen Oberflächen beeinflussen. An fest-flüssigen Grenzflächen ist die fundamentale Grundlage für spontane Adsorption, dass nach Gibb's Gesetz der freien Energie mehr Energie freigesetzt als gewonnen wird. Dies bedeutet eine Zunahme der Entropie oder Abnahme der Enthalpie [Hannig und Hannig, 2009].

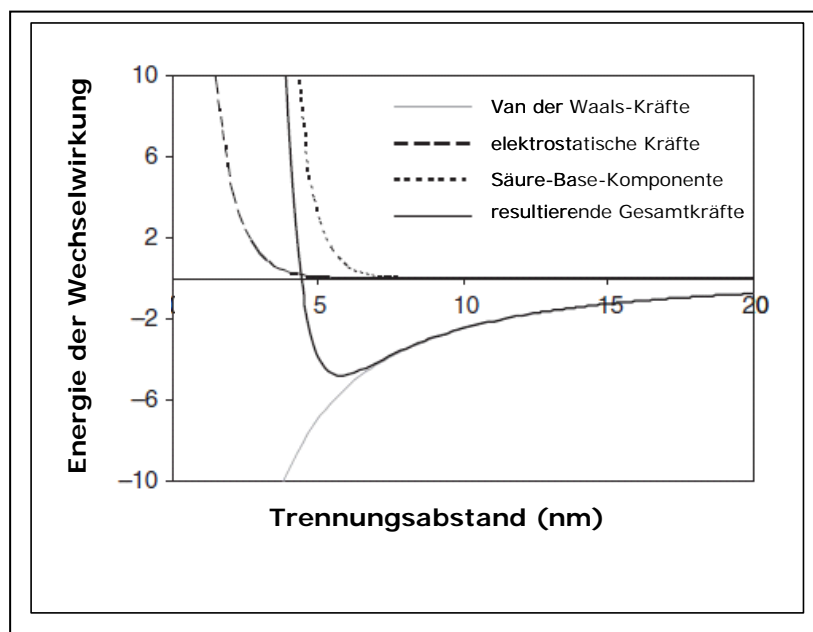


Abbildung 14: Energieverlauf zwischen zwei Oberflächen in Abhängigkeit vom Trennungsabstand, beschrieben nach der DLVO-Theorie (modifiziert nach Busscher *et al.*, 2010). Für die elektrostatischen Kräfte ist hier ein geringer Trennungsabstand skizziert, der jedoch eine hohe Ionendichte in der Lösung voraussetzen würde. Säure-Base-Komponenten sollten vor allem in Zusammenhang mit biologischen Systemen eine Rolle spielen.

Für die Beschreibung der Interaktion zwischen Oberflächen in wässrigen Lösungen (Elektrolytlösungen) werden üblicherweise elektrostatische Kräfte und Van-der-Waals-Kräfte herangezogen. Nach der DLVO-Theorie (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) für kolloidale Systeme wirken in Elektrolytlösungen repulsive, elektrostatische Kräfte und anziehende Van-der-Waals-Kräfte [van Oss *et al.*, 1986; Busscher *et al.*, 1990; Quirynen und Bollen, 1995; van Oss, 2003; Teughels *et al.*, 2006; Busscher *et al.*, 2010]. Nach eigener Einschätzung ist dabei die Reichweite der elektrostatischen Kräfte ganz entscheidend abhängig von der Ionendichte der Elektrolytlösung. In Lösungen mit hoher Ionendichte sollte die Reichweite der elektrostatischen Kräfte geringer sein als diejenige der Van-der-Waals-Kräfte. Die Energie der Wechselwirkung (*interaction energy*) zwischen zwei Oberflächen ist insgesamt abhängig vom Trennungsabstand (*distance-dependent interaction energy*) [van Oss *et al.*, 1986; Busscher *et al.*, 1990; Quirynen und Bollen, 1995; van Oss, 2003; Teughels *et al.*, 2006; Busscher *et al.*, 2010].

Die Adsorption von Proteinen des Speichels an eine feste Oberfläche und damit die Ausbildung eines Pellikels ist das Resultat verschiedener Wechselwirkungen zwischen den wässrigen Elektrolyten, der Materialoberfläche und den Proteinen selbst. Die für die Proteinadsorption wichtigen Kräfte sind die Van-der-Waals- und Coulomb-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen, welche in Wasser die wichtigste Rolle spielen, elektrostatische Wechselwirkungen, kovalente Bindungen und Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen und auch Lewis Säure-Basen-Reaktionen [Hannig und Hannig, 2009]. Die Reichweiten dieser Kräfte sind sehr stark abhängig von der Qualität der elektrolytischen Lösung und sollten daher nicht verallgemeinert werden. So sind Angaben wie diejenigen für Van-der-Waals- und Coulomb-Kräfte als weitreichende Kräfte (50-100 nm), hydrophobe Wechselwirkungen als solche mit mittlerer Reichweite (10-50 nm) oder elektrostatische Wechselwirkungen mit kurzen Reichweiten (unter 5 nm) wohl nur unter näher definierten Bedingungen zutreffend [Hannig und Hannig, 2009]. Die Adsorption von Proteinen auf Substratoberflächen geht nach der initialen Adhäsion mit einer Änderung der Proteinstruktur einher. Geladene Gruppen von Proteinen werden aufgrund der Polarität der Oberflächen neu ausgerichtet und damit verändert sich die Hydratation sowohl der Oberfläche als auch der adsorbierten Proteine selbst [Norde, 1995].

Die initiale bakterielle Adhäsion auf einer pellikelbeschichteten Oberfläche dagegen ist zunächst eine schwache und reversible Adhäsion. Diese wird durch Fimbrien auf der Bakterienoberfläche über mittlere und weitreichende Kräfte, wie etwa hydrophobe Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, Kalziumbrücken, elektrostatische Wechselwirkungen oder Säure-Basen-Reaktionen vermittelt. Schließlich können spezifische Wechselwirkungen zwischen Liganden (Rezeptoren) auf Proteinen des Speichels und Adhäsinen auf der Bakterienoberfläche entstehen [Hannig und Hannig, 2009]. Nach momentanem Paradigma werden substratspezifische Oberflächeneigenschaften bis zu einem gewissen Grad von dem entstandenen Pellikel in Abhängigkeit von dessen Dicke maskiert. Lediglich mittlere und weitreichende Kräfte der Wechselwirkung zwischen Oberflächen und angenäherten Bakterien werden durch sie hindurch transferiert. Mit seiner Zusammensetzung, den Rezeptoren, enzymatischen Aktivitäten, Scherkräften sowie entstehenden antibakteriellen Proteinen, etwa Defensinen, scheint das gebildete Pellikel verschiedenste Möglichkeiten zum weiteren Einfluss auf bakterielle Adhäsion und die initiale Biofilmbildung zu haben [Hannig und Hannig, 2009].

5.2 Hydrophobizität von Materialoberflächen und Proteinadsorption

5.2.1 Grundlagen

Festkörper und Flüssigkeiten besitzen eine definierte Oberflächenspannung, die auf den Kohäsionskräften zwischen den Atomen oder Molekülen eines Festkörpers oder einer Flüssigkeit basiert. Es handelt sich dabei um die spezifische Energie, die notwendig ist, um Moleküle aus dem Inneren einer Materie an die Oberfläche zu bringen. Bei direktem Kontakt zwischen einem Festkörper und einer Flüssigkeit an der Luft entsteht als spezielle Form der Oberflächenspannung eine Grenzflächenspannung zwischen Festkörper, Flüssigkeit und Luft [Geckeler *et al.*, 1997; Leckband und Israelachvili, 2001]. Eine Festkörperoberfläche ist hydrophil, wenn die Grenzflächenspannung kleiner ist als die Oberflächenspannung von Festkörper und Flüssigkeit, wobei die Oberfläche dann benetzbar ist. Umgekehrt ist eine Oberfläche hydrophob, wenn die Grenzflächenspannung höher ist als diese Oberflächenspannung von Festkörper und Flüssigkeit. Wassermoleküle können mit nicht-polaren

Oberflächen keine Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und orientieren sich nach den benachbarten Wassermolekülen, mit welchen dies möglich ist. Daher sind hydrophobe Oberflächen mit Wasser kaum benetzbar [Geckeler *et al.*, 1997; Leckband und Israelachvili, 2001].

Der Kontaktwinkel zeigt das Ausmaß der Benetzbarkeit einer Oberfläche [Geckeler *et al.*, 1997; Leckband und Israelachvili, 2001]. Nach der Methode des liegenden Tropfens, eines optischen Verfahrens, bestimmt man mittels eines Goniometers den Winkel zwischen der Festkörperoberfläche und der Tangente, die am Dreiphasenpunkt zwischen Festkörperoberfläche, Flüssigkeitstropfen und Luft angelegt wird. Die hier gewählte Methode zur Ermittlung des statischen Kontaktwinkels ist an eine definierte Arbeitsweise gebunden, denn durch Sedimentation, Verdunstung, Veränderung der Flüssigkeit oder der Festkörperoberfläche kann sich der Kontaktwinkel verändern. Dabei wird er durch die Young'sche Gleichung beschrieben und zeigt den Zusammenhang zwischen der Oberflächenenergie des Festkörpers, der Grenzflächenenergie zwischen Festkörper und Flüssigkeitstropfen sowie der Oberflächenenergie des Flüssigkeitstropfens [Young, 1805].

Wasser ist eine Flüssigkeit mit hoher Oberflächenspannung. Es wird als Lösungsmittel aller biologischen Systeme üblicherweise zur Charakterisierung der Oberflächeneigenschaften von Biomaterialien verwendet [Geckeler *et al.*, 1997; Leckband und Israelachvili, 2001]. Weil auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Werkstoffe in ihrer klinischen Anwendung als Biomaterialien in einer wässrigen Umgebung fungieren, wurde die Benetzbarkeit ihrer Oberflächen mit Wasser in erster Näherung als eine ihrer physiko-chemischen Eigenschaften ermittelt. Auf die Unterscheidung polarer Anteile, die in der Regel sehr klein sind, und dispersiver Anteile der Oberflächenenergie nach der Theorie von Owens-Wendt-Rabel-Kaelble (OWRK) wurde für den begrenzten Zweck der Arbeit verzichtet [Owens und Wendt, 1969; Rabel, 1971]. In einer Analyse zur Struktur von Wasser und ihrer Veränderung an Oberflächen wurden Oberflächen mit Netzwinkeln größer als 65° als hydrophob bezeichnet, solche mit kleineren Netzwinkeln sollten hydrophile Oberflächen kennzeichnen [Vogler, 1998]. Auf diese Weise wurden Polytetrafluorethylen (108°), Polyethylen (94°) und Polymethylmethacrylat (80°), die auch hier verwendet wurden, als Werkstoffe mit hydrophoben Oberflächen charakterisiert [Vogler, 1998].

Dem entsprechend wurden PTFE (Polytetrafluorethylen), PE (Polyethylen) und Silikon mit Netzwinkeln zwischen 90,5° und 105,5° nach Lagerung in PBS als stark hydrophob eingestuft, während PMMA (Polymethylmethacrylat), die Komposite Filtek Siloran und TetricEvoCeram, sowie Titan und CoCrMo mit Netzwinkeln zwischen 61,75° und 79,25° als schwach hydrophob betrachtet wurden.

Die hier gemessenen Netzwinkel der verschiedenen Materialien gegen Wasser sind identisch mit denjenigen in einer parallel entwickelten Arbeit zur Charakterisierung der Adsorption von humanem Serumalbumin und humanem Speichel [Carl, 2010]. Außerdem gibt es eine Übereinstimmung mit entsprechenden Berichten in der Literatur. Polytetrafluorethylen (PTFE) mit einem Netzwinkel von 106° wurde auch von anderen als stark hydrophobes Material eingestuft, wie auch Silikon (95°) oder Polyethylen (PE) (91°) [Hoffman, 1986; Gottenbos *et al.*, 2000]. Der Netzwinkel des PMMA von 61° liegt etwas unter denjenigen anderer Autoren, dennoch besitzt PMMA eine als hydrophob eingestufte Oberfläche [Gottenbos *et al.*, 2000]. Das Silorankomposit Filtek Siloran (79°) zeigt im Vergleich mit dem konventionellen Komposit TetricEvoCeram (65°) eine höhere Hydrophobizität. Dies wurde aufgrund der chemischen Zusammensetzung aus Oxirane und Siloxane bereits vermutet, da besonders der Bestandteil der Siloxane für die gesteigerte Hydrophobizität des Biomaterials verantwortlich ist [Weinmann *et al.*, 2005; Hahnel *et al.*, 2010]. Vergleichbare Werte wurden auch von anderen Autoren berichtet [Bürgers *et al.*, 2009; Hahnel *et al.*, 2010]. Für die beiden Metalle CoCrMo und Titan wurden Winkel von etwa 64° gemessen, die in der gleichen Größenordnung innerhalb der Literatur gefunden wurden [Bürgers *et al.*, 2009]. Lediglich die Oberfläche des Glasionomerzements Ketac Molar wurde als hydrophil bestimmt. Aufgrund der chemischen Zusammensetzung der Materialien (vgl. Kapitel 3.1.4) sind diese Messungen der Kontaktwinkel unter Berücksichtigung der oben diskutierten Parameter zur Hydrophilie und Hydrophobizität plausibel und erklärbar.

5.2.2 Die Benetzbarkeit von Oberflächen in Abhängigkeit adsorbierter Proteine

Die Adhäsion von *S. gordonii* DL1 auf Werkstoffoberflächen wurde mit und ohne Beschichtung mit humanem Speichel bestimmt. Zur näheren Charakterisierung der Rolle der Hydrophobizität der Oberflächen wurden Netzwinkel gegen Wasser auch

mit den speichelbeschichteten Werkstoffen bestimmt. Nach einem frühen Paradigma sollte eine auf der Oberfläche von Materialien oder Biomaterialien adsorbierte Proteinschicht zu einer Angleichung oder Nivellierung der Oberflächenenergie führen, welche durch den experimentell bestimmbaren Netzwinkel gegen Wasser ausgedrückt wird. Materialoberflächen mit ursprünglich großem Netzwinkel oder relativ niedriger Oberflächenenergie sollten nach der Beschichtung mit Proteinen, auch aus physiologischen Proteinlösungen, wie Blut oder Speichel, eine höhere Oberflächenenergie oder eine stärkere Benetzbarkeit mit Wasser erfahren. Umgekehrt sollte die relativ niedrige Oberflächenenergie ursprünglich hydrophober Oberflächen nach Adsorption einer Proteinlösung größer werden [van Dijk *et al.*, 1987; Morge *et al.*, 1989; Müller *et al.*, 2007].

Ihre Plausibilität gewinnt diese Modellvorstellung möglicherweise aus der bekannten Tatsache, dass Proteine amphiphile Moleküle sind. Verschiedene Proteine einer Lösung oder Domänen eines Proteins würden sich nach der Adsorption an Oberflächen entfalten und unterschiedliche Anteile hydrophiler oder hydrophober Abschnitte an der äußeren Oberfläche exponieren. Dieses Phänomen würde über die Bestimmung des Netzwinkels detektiert werden. Somit ist denkbar, dass hydrophobe Abschnitte oder Domänen von Proteinen an hydrophobe Oberflächen binden und so hydrophile Proteinstrukturen zur Oberfläche gedreht werden. Auf diese Weise könnte die Hydrophobizität einer Oberfläche reduziert werden. Umgekehrt würde die Bindung geladener oder polarer Gruppen von Proteinen und komplementärer funktioneller Gruppen auf hydrophilen Oberflächen eher hydrophobe Abschnitte von Proteinen an die Oberfläche bringen, deren Hydrophobizität auf diese Weise insgesamt zunähme.

Diese Theorie wird unterstützt durch experimentelle Daten mit Self-Assembled-Monolayers (SAMs) auf Siliziumwafern als Modelloberflächen mit kontrolliert veränderten funktionellen chemischen Gruppen [Müller *et al.*, 2007]. Die ursprünglich sehr hydrophile Oberfläche oxidierten Wafer (etwa 10°) mit funktionellen OH-Gruppen war nach der Adsorption von Proteinen weniger hydrophil, während umgekehrt die auf hydrophoben Oberflächen mit funktionellen CH₃- oder CF₃-Gruppen adsorbierten Proteinen diese hydrophiler machten (Abb. 15). Dabei ist jedoch, möglicherweise für hydrophile Oberflächen mehr als für hydrophobe, sehr genau darauf zu achten, welche Proteine verwendet wurden. So reduzierte Fibronektin, ein für die Adhäsion von Mikroorganismen relevantes Glykoprotein der extrazellulären Matrix, auf den

oxidierten Wafern die Hydrophilie weit mehr (60°) als etwa humanes Serumalbumin, humaner Speichel oder Serum für die Zellkultur [Müller *et al.*, 2007]. Für eine ebenfalls hydrophile, allerdings mit Polyethylenglykol (PEG) modifizierte, Oberfläche wiederum war die Änderung der Hydrophilie mit den genannten Proteinen weniger deutlich als auf den oxidierten Oberflächen. Auf der hydrophoben, mit CH_3 -Gruppen funktionalisierten Oberfläche erzeugte eine Beschichtung mit Proteinen zwar eine höhere Hydrophilie, allerdings war hier kein Unterschied in der Wirkung der unterschiedlichen Proteinlösungen erkennbar. Ähnliches wurde mit der extrem hydrophoben CF_3 -modifizierten Oberfläche beobachtet, auf der auch nur eine sehr geringe Proteinmenge nachzuweisen war. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Menge an adsorbierten Proteinen und der Änderung des Netzwinkels wurde allerdings nicht beobachtet [Müller *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2008]. Ob die geringere Menge adsorbierter Proteine auf den hydrophoben Oberflächen geringere Unterschiede in der Veränderung der Netzwinkel verursacht, ist momentan nicht bekannt.

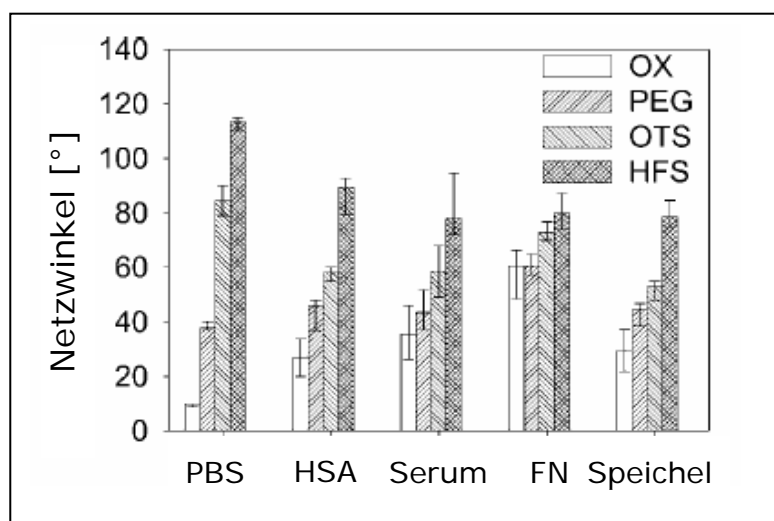


Abbildung 15: Netzwinkel gegen Wasser auf Modelloberflächen. Siliziumwafer mit oxidierten (OX) Oberflächen oder solchen, die mit Polyethylenglykol (PEG), einer Oxytgruppe (CH_3 -, OTS) oder einer Heptadecafluorotetrahydrodecylgruppe (CF_3 -, HFS) funktionalisiert waren, wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), humanem Serumalbumin (HSA), Fibronectin (FN) oder humanem Speichel beschichtet. Die Abbildung wurde modifiziert nach Müller *et al.*, 2007.

Ein ähnlicher Einfluss einer Proteinbeschichtung auf den Netzwinkel an Oberflächen war mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht zwingend nachvollziehbar. Zwar wurde für die meisten der als stark oder moderat hydrophob eingestuften

Oberflächen eine Reduktion des Netzwinkels und damit eine Steigerung der Hydrophilie ermittelt, aber der Netzwinkel für die hydrophoben Oberflächen PE (Polyethylen) und Silikon blieb nach der Beschichtung mit Speichelproteinen unverändert hoch. Dabei war die Menge an adsorbierten Speichelproteinen auf PE ungefähr um den Faktor 3 höher als auf Silikon [Carl, 2010]. Interessant war auch die Beobachtung, dass die ohnehin schon sehr hydrophile Oberfläche des Glasionomerkements Ketac Molar nach der Beschichtung mit humanem Speichel nicht hydrophob wurde, sondern nun mit Wasser vollständig benetzbar war. Dabei war die adsorbierte Proteinmenge in etwa so hoch wie auf Titan oder auf dem Kompositwerkstoff [Carl, 2010]. Somit korrelierte auch die Menge adsorbierter Speichelproteine nicht mit der Benetzbarkeit der hier analysierten Oberflächen. Nach Korrelationsanalysen wurden in der Tendenz für den weiteren Bereich hydrophiler Netzwinkel (55° - 75°) relativ geringe Unterschiede für die Adsorption von Speichelproteinen ermittelt, während im stark hydrophoben Bereich der Netzwinkel (100° - 120°) die Mengen adsorbierter Speichelproteine abhängig von den Oberflächen unterschiedlich waren [Carl, 2010]. Ähnliche Beobachtungen wurden für experimentelle Harze auf der Basis von UDMA (Urethandimethacrylat) mit verschiedenen Kettenlängen und funktionellen Gruppen berichtet. Die Beschichtung der unterschiedlichen Oberflächen mit Speichel führte zwar tendenziell zu geringeren Netzwinkeln mit Wasser, jedoch waren diese Veränderungen sehr heterogen. Ein einheitlich nivellierender Effekt der Speichelbeschichtung auf die Benetzbarkeit mit Wasser sollte aus diesen Resultaten nicht abgeleitet werden [Hahnel *et al.*, 2008]. Andererseits stieg die freie Oberflächenenergie verschiedener Adhäsivsysteme nach der Beschichtung mit einer Muzinlösung tendenziell. Allerdings waren die Unterschiede zu den Oberflächenenergien der unterschiedlichen Systeme vor der Beschichtung gering [Leyer, 2010].

Damit ist die Diskussion eines einfachen Zusammenhangs zwischen der Oberflächenenergie von Oberflächen und ihrer Veränderung nach der Adsorption von Proteinen insgesamt wenig hilfreich. Eine Nivellierung der Oberflächenenergie nach Adsorption von Proteinen kann momentan nicht allgemein angenommen werden. Selbst dort, wo sich ein entsprechender Trend abzeichnen könnte, ist nicht bekannt, ob auch dieselben Proteine dieselbe Änderung der Hydrophobizität auf unterschiedlichen Oberflächen verursachen. Möglicherweise führt eine ganz andere Population von Proteinen aus einer komplexen Lösung wie Serum oder Speichel

zum selben Phänomen einer gleichermaßen hydrophoben Oberfläche. Die gezielte Identifizierung spezifischer Proteine auf unterschiedlichen Oberflächen mit proteinchemischen Methoden wie 2D-PAGE mit MALDI-TOF sollte darauf Hinweise geben können.

Damit erlaubt die Information über die Oberflächenenergie auch nicht zwingend den Schluss auf die Mengen adsorbierter Proteine. Außerdem ist nicht vorhersagbar, welche Proteine aus unterschiedlichen Lösungen spezifisch und selektiv an Oberflächen adsorbieren. Neben der Menge an adsorbierten Proteinen wird die Adhäsion von Bakterien oder Zellen wesentlich von der Zusammensetzung einer Proteinschicht auf Oberflächen und den insgesamt verfügbaren funktionellen Gruppen beeinflusst. Sie entscheidet darüber, ob und in welcher Häufigkeit spezifische Bindungen über Liganden in Proteinen zu Rezeptoren auf Zelloberflächen auf welcher Materialoberfläche möglich sind [Müller *et al.*, 2006].

So ergibt sich momentan ein sehr komplexes Bild für die Proteinadsorption auf unterschiedlichen Biomaterialien, das mit den Parametern des Netzwinkels gegen Wasser oder über die Bestimmung der Oberflächenenergie allein nicht zu erklären ist. Funktionelle chemische Gruppen, die hydrophobe oder hydrophile Oberflächen erst spezifisch erzeugen, sowie Lösungsmittel, pH-Wert, Ionen und Ionenstärke spielen eine entscheidende Rolle. Diese Faktoren wirken auf und verändern die funktionellen Gruppen an der Oberfläche von Proteinen und bestimmen so die Adsorption unterschiedlicher Proteine aus physiologischen Lösungen quantitativ und selektiv. Proteine verändern dadurch ihre Struktur und damit möglicherweise ihre biologische Funktion oder verändern oder erlauben so die spezifische Adhäsion bestimmter Bakterienspezies. Ergänzend zu den vielen Ergebnissen, die aus *in vitro* Untersuchungen stammen, sollten nach Möglichkeit auch Analysen *in vivo* durchgeführt werden. Es wurde berichtet, dass *in vitro* gebildete Pellikel weniger hydrophob waren als solche, die in einer klinischen Situation entstanden [van der Mei *et al.*, 2002].

5.2.3 Eigenschaften der Oberfläche von *Streptococcus gordonii*

Die Oberflächenrauigkeit und die Oberflächenenergie sind zwei Parameter, die als wesentlich für die Adhäsion von Bakterien an Oberflächen diskutiert werden. So gibt

es in der wissenschaftlichen Literatur viele Hinweise darauf, dass die Oberflächenenergie von Werkstoffen und diejenige von Mikroorganismen deren Adhäsion bestimmen. Bakterien mit hydrophilen Oberflächen sollten bevorzugt an hydrophile Substratoberflächen binden, und umgekehrt sollten hydrophobe Oberflächen die Adhäsion hydrophober Organismen fördern [Absolom *et al.*, 1983; Uyen *et al.*, 1985; Pratt-Terpstra *et al.*, 1987; An und Friedman, 1998; Bakker *et al.*, 2004].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Adhäsion von Mikroorganismen auf Werkstoffoberflächen einschließlich solcher, die häufig in der restaurativen Zahnheilkunde verwendet werden, mit dem Stamm *Streptococcus gordonii* DL1 analysiert. Streptokokken besiedeln viele Nischen der Mundhöhle und gehören zu den häufigen Organismen der dentalen Plaque [Nyvad und Kilian, 1987; Frandsen *et al.*, 1991]. Wachstum und Überleben der Streptokokken hängen auch von ihrer Fähigkeit ab, an orale Oberflächen zu adhären, welche selbst mit Speichelproteinen und Glykoproteinen überzogen sind. Dazu und für die Vergesellschaftung mit anderen Organismen, wie etwa Actinomyceten, dienen auf der äußeren Oberfläche der Streptokokken selbst eine Reihe von Adhäsinen, die meist auf Fibrillen oder Fimbrien exprimiert sind [Handley *et al.*, 1985; Jenkinson und Lamont, 1997].

Diese fibrillären Strukturen etwa auf *S. gordonii* oder *S. sanguis* wurden oft mit der Adhäsion auf speichelbeschichteten Oberflächen und mit der Hydrophobizität der Oberfläche der Bakterien in Verbindung gebracht [Gibbons *et al.*, 1983; Harty *et al.*, 1990; McNab *et al.*, 1995]. Diese Annahmen sind für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse, weil die Oberflächen der hier untersuchten Werkstoffe auch nach der Beschichtung mit Speichel unterschiedlich hydrophob sind und dieser Parameter möglicherweise die Adhäsion von *S. gordonii* DL1 beeinflussen könnte. Die Hydrophobizität von *S. gordonii* DL1 basiert auf der Expression von CshA, einem Hauptprotein der Bakterienzellwand, das an der Bildung von Fibrillen beteiligt ist [McNab und Jenkinson, 1992; McNab *et al.*, 1999]. Außerdem wurde berichtet, dass Mutanten von *S. gordonii* DL1 mit erhöhter Hydrophobizität auch vermehrt das CshA-Protein exprimierten und stärker mit *Actinomyces* aggregierten [Jenkinson und Carter, 1988]. In CshA-defizienten Mutanten wiederum waren die Hydrophobizität sowie ihre Fähigkeit, an *Actinomyces naeslundii* oder *S. oralis* zu binden, eingeschränkt [McNab *et al.*, 1994; McNab *et al.*, 1996]. CshA-ähnliche Proteine

wurden in *S. gordonii*, *S. oralis* und *S. sanguis* gefunden, nicht jedoch in der Mutans-Gruppe [McNab *et al.*, 1995]. Es sollte jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass *S. gordonii* DL1 in einer *in vitro* Untersuchung durchaus auch an eine sehr hydrophile Modelloberfläche ohne weitere Modifizierung stark adhärierte [Müller *et al.*, 2007].

5.3 Methoden der Bakteriendetektion auf Oberflächen

Für den quantitativen Nachweis der auf Werkstoffoberflächen adhärierten Mikroorganismen steht ein breites Spektrum von Methoden *in vivo* und *in vitro* zur Verfügung. Abhängig von der originären primären Fragestellung sind *in vitro* Analysen auf Einzelzellebene ebenso möglich wie der Nachweis der in komplexen Biofilmen vergesellschafteten Organismen in statischen oder dynamischen Systemen (Fließkammer). Biofilmbildung kann außerdem analytisch im Tiermodell oder in klinischen Studien verfolgt werden [Leonhardt *et al.*, 1995; Gottenbos *et al.*, 2003; Meier *et al.*, 2008; Rosentritt *et al.*, 2008].

Für den quantitativen Nachweis der auf Oberflächen adhärierten Bakterien *in vitro* werden als direkte *in situ* Verfahren die Darstellung mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie verwendet [Liu *et al.*, 2008; Rosentritt *et al.*, 2008; Bürgers *et al.*, 2010; Hahnel *et al.*, 2010]. Außerdem können Mikroorganismen mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops (AFM) [Beyth *et al.*, 2007; Tedjo *et al.*, 2007; Boks *et al.*, 2008] oder des Rasterelektronenmikroskops [Hahnel *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Namba *et al.*, 2009] visualisiert und quantifiziert werden. Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM) bietet nach Fluoreszenzfärbung neben der sehr aufschlussreichen Unterscheidung zwischen dem Anteil lebender oder toter Zellen in einem Biofilm auch den Vorteil der Rekonstruktion der Eigenschaften seiner dreidimensionalen Architektur [Auschill *et al.*, 2002; Al-Ahmad *et al.*, 2008]. Damit erlauben die direkten mikroskopischen Methoden die unmittelbare Darstellung adhärierter Mikroorganismen. Die Quantifizierung ist allerdings wegen der mitunter sehr kleinen Ausschnitte, die erfasst werden können, sehr aufwendig.

Indirekte Methoden erfordern zunächst die manchmal schwierig zu kontrollierende Entfernung der Mikroorganismen oder eines Biofilms von der Oberfläche. Erst dann ist die Quantifizierung von radioaktiv markierten Bakterien mit anschließender

Szintigrafie möglich [Steinberg und Eyal, 2002; Lima *et al.*, 2008]. Manchmal genügt auch eine einfache Spektrophotometrie oder der Nachweis spezifischer Stoffwechselprodukte. Genau wie diese setzen numerische Verfahren mittels Partikelzähler oder Durchflusszytometrie meist eine relativ hohe Zellzahl für zuverlässige Ergebnisse voraus [Gottenbos *et al.*, 2000; Ebi *et al.*, 2001; Gottenbos *et al.*, 2003; Beyth *et al.*, 2007]. Umgekehrt können mit der *real time*-PCR sehr geringe Zellzahlen nachgewiesen werden. Dennoch ist diese Methode relativ zeit- und kostenintensiv [Namba *et al.*, 2009]. Eine weitere einfache Methode zur Quantifizierung von Bakterien ist Kolonisation auf Agarplatten mittels Replikatechnik oder aber die Bestimmung der Zahl koloniebildender Keime auf selektiven Nährböden [Müller *et al.*, 2007].

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Nachweisreaktion mittels Biotin/Avidin erlaubt den direkten quantitativen Nachweis von Bakterien auf sehr kleinen Oberflächen. Bei dieser Reaktion bindet das Sulfo-NHS-Biotin unter Spaltung einer Esterbindung kovalent an freie Aminogruppen an der Oberfläche eines Bakteriums. Das eingebrachte Avidin D- Avidin D-HRP (*horseradish peroxidase*) bindet seinerseits an Biotin. Die horseradish peroxidase oxidiert den Farbstoff Luminol, einen Bestandteil des ECL-Systems. Letztlich wird dann durch Belichtung eines Röntgenfilms die Bakterienadhäsion auf Oberflächen oder, wie in der vorliegenden Arbeit, auf Prüfkörpern in ein sichtbares Ergebnis überführt. Anhand unterschiedlicher Graustufen, die von unterschiedlichen Oberflächen stammen, wird im Vergleich zu den Grauwerten bekannter Bakterienzahlen in Eichkurven mit einer geeigneten Software die Menge an Bakterien auf den Werkstoffoberflächen errechnet [Ruhl *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2007].

Bakterielle Overlay-Methoden sind bis heute bewährte Mittel zur Untersuchung von Adhäsion-vermittelten Bindungen an Glykolipid- oder Glykoproteinrezeptoren. Bis vor kurzem war diese Methode allerdings nicht zur Quantifizierung von Bakterien auf kleinen Oberflächen etabliert. Die direkte Replika-Methode mittels Kolonisation auf Agarplatten benötigt lebende Bakterien und kann nur mit solchen Bakterien bebrütet werden, die auf das Medium übertragbar sind. Ungenauigkeiten können dadurch entstehen, dass eine ungewisse Anzahl an Bakterien auf der Materialoberfläche bleiben könnte und somit nicht erfasst wird. Das Rasterelektronenmikroskop bietet Momentaufnahmen und zeigt nur die wirklich festsitzenden Bakterien auf der

Oberfläche. Es ist nicht auszuschließen, dass während der Probenaufbereitung Zellen verloren gehen können. Alternative Methoden und Techniken, wie vorher genannt, benötigen meist eine große Oberfläche, um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen. Die zu wählende Technik bleibt allerdings immer abhängig vom Material und der jeweiligen Fragestellung [Müller *et al.*, 2007]. Die Vorteile der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode des Bakterien-Overlays sind die relativ einfache Detektion, die Möglichkeit zur simultanen Auswertung einer großen Zahl von Prüfkörpern oder Oberflächen und der Nachweis relativ kleiner Bakterienmengen auf kleinen Oberflächen [Ruhl *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2007].

5.4 Bakterienadhäsion auf unterschiedlichen Biomaterialien

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Materialien werden in der Medizin für ganz unterschiedliche Zwecke verwendet. Manche von ihnen sind ausschließlich als Füllungs- oder Unterfütterungsmaterialien in der Zahnmedizin und zahnärztlichen Chirurgie in Gebrauch. Andere dagegen werden im gesamten Bereich der Medizin als Implantatwerkstoffe genutzt. Die Frage nach der initialen Adhäsion von Mikroorganismen auf diesen Werkstoffen ist in den benannten medizinischen Bereichen klinisch von großer Bedeutung. Oberflächen, die eine schnelle Adhäsion erlauben, bergen ein erhöhtes Risiko, dass darauf Biofilme entstehen, welche die Struktur und Funktion von Implantatwerkstoffen beeinträchtigen und zu unerwünschten infektiösen Krankheitsbildern führen können. Biofilme auf dentalen Werkstoffen fördern oder bedingen Karies, Parodontitis oder Periimplantitis auf Implantatwerkstoffen, die zu Infektionen führen können, die mindestens den Verlust des Implantats bedeuten [Costerton *et al.*, 1999; Busscher *et al.*, 2010; Mombelli und Décaillot, 2011]. Im Folgenden sollen dazu der Einfluss der Hydrophobizität von Werkstoffoberflächen, des Speichels, sowie der Eigenschaften der Werkstoffe selbst auf die Adhäsion von *S. gordonii* DL1 erläutert werden.

5.4.1 Der Einfluss der Hydrophobizität reiner Werkstoffoberflächen auf die Adhäsion von Mikroorganismen

Die Bioadhäsion an verschiedenen Materialien ist ein komplexer Vorgang, welcher von enorm vielen Faktoren abhängig ist (siehe Kapitel 5.1). Bakterielle Adhäsion an Oberflächen kann auch ohne spezifische Speichelproteine auftreten und demzufolge können Materialien per se die Kolonisation beeinflussen [Montanaro *et al.*, 2004]. Als ein physiko-chemischer Faktor dafür wird auf ansonsten glatten Oberflächen die auch in dieser Arbeit untersuchte Hydrophobizität der Materialien diskutiert [Müller *et al.*, 2007; Hahnel *et al.*, 2010].

Die meisten Zellen für *S. gordonii* DL1 wurden hier auf der hydrophilen Oberfläche des Glasionomerzements Ketac Molar nachgewiesen. Auch auf den Oberflächen von Titan oder CoCrMo wurden relativ viele Zellzahlen gefunden. Eine vergleichsweise geringe Zellzahl wurde hingegen auf den hydrophoben Oberflächen von PTFE oder Filtek Siloran ermittelt (Abb. 8). Regressionsanalysen zeigten eine negative Korrelation zwischen steigenden Netzwinkeln auf Werkstoffoberflächen ohne Beschichtung mit humanem Speichel und den Zellzahlen für *S. gordonii* DL1, auch wenn die Unterschiede zwischen den Zellzahlen mit höchstens Faktor 3 über den hier bestimmten Bereich der Hydrophobizität klein waren (Abb. 9).

Ein negativer Zusammenhang zwischen den Netzwinkeln und der Adhäsion von *S. gordonii* war so nicht unbedingt zu erwarten, denn folgt man den Überlegungen zur Thermodynamik, würde man gerade das Gegenteil vermuten. Üblicherweise werden hydrophile Oberflächen als solche diskutiert, die einer initialen Adhäsion der Bakterien eher widerstehen als hydrophobe [Müller *et al.*, 2007]. Wenn man, wie oben diskutiert, annimmt, dass der hier verwendete Stamm *S. gordonii* eine eher hydrophobe Oberfläche aufweist, würde man erwarten, auf den unbehandelten hydrophoben Oberflächen mehr Zellen als auf den unbehandelten hydrophilen Oberflächen zu finden. Es ist allerdings auch möglich, dass unter den hier gewählten Bedingungen mit PBS als Lösungsmittel die Oberfläche von *S. gordonii* eher hydrophil sein könnte. Nicht auszuschließen ist aber auch, dass nicht die Hydrophilie alleine ein Kriterium ist, sondern auch die chemischen Gruppen an der Grenzfläche, die diese Benetzbarkeit mit Wasser erst erzeugen. Dazu wären Analysen mit mehr Oberflächen hilfreich, die dieselbe Benetzbarkeit aufgrund unterschiedlicher chemischer Funktionalität zeigen. Hinweise auf die Bedeutung der Funktionalität von

Oberflächen für die Besiedlung mit Mikroorganismen geben auch die hier erzielten Ergebnisse mit dem stark hydrophoben Filtek Siloran. Auch andere Autoren fanden, dass die sehr hohe Hydrophobizität einer glatten Oberfläche des Silorankomposits nur eine geringe Bakterienadhäsion erlaubte. Andere hydrophobe Komposite auf Acrylatbasis hingegen wurden durchaus, ähnlich wie das TetricEvoCeram in der vorliegenden Arbeit, von einer relativ großen Zahl von Bakterien besiedelt [Bürgers *et al.*, 2009; Hahnel *et al.*, 2010].

Insgesamt ergibt sich momentan hinsichtlich der Funktion der Hydrophobizität von Oberflächen für die Adhäsion von Mikroorganismen kein einheitliches Bild. Frühere Analysen interpretieren durchaus einen direkten Zusammenhang zwischen der Hydrophobizität der Bakterienoberfläche und derjenigen von Werkstoffen für die Adhäsion der Zellen [Uyen *et al.*, 1985; Pratt-Terpstra *et al.*, 1987; Suljak *et al.*, 1995]. In frühen klinischen Untersuchungen beispielsweise wurde weniger dentale Plaque auf Oberflächen mit geringerer Oberflächenenergie als auf hydrophilen Substraten gefunden. Allerdings war die Zusammensetzung der Plaque auf hydrophoben und hydrophilen Oberflächen nicht verschieden. Man nahm nun für diese *in vivo*-Analysen an, dass die Mehrheit der Mikroorganismen der Mundhöhle eine hohe Oberflächenenergie aufwiesen und daher bevorzugt auf hydrophilen Oberflächen adhärten, während Mikroorganismen mit geringer Oberflächenenergie in der Mundhöhle eher selten wären. Für einen bestimmten Bakterienstamm stimmten diese thermodynamischen Überlegungen auch für die Adhäsion auf blanken Oberflächen *in vitro*. Allerdings wurden die Eigenschaften von Substratoberflächen durch die Adsorption von Speichel rasch verändert [Busscher und van der Mei, 1997].

Bemerkenswert ist auch der Bericht über signifikante Unterschiede der Adhäsionskräfte vier verschiedener *Staphylococcus epidermidis*-Stämme an hydrophilen und hydrophoben Oberflächen. Auf hydrophoben Oberflächen wurde eine rasche Bindung beobachtet, jedoch war die Adhäsionskraft limitiert und der Adhäsionsvorgang von hydrophoben Wechselwirkungen beeinflusst. Auf hydrophilen Oberflächen dagegen wurde die Bindungsstärke mit länger dauerndem Kontakt größer, da möglicherweise durch Umordnung äußerer Zellstrukturen Wasserstoffbrücken gebildet wurden. Folglich sollten die Adhäsionskräfte auf den hydrophilen Oberflächen stärker sein als auf den hydrophoben [Boks *et al.*, 2008]. Außerdem ist anscheinend die Teilungsrate von Bakterien auf Oberflächen viel stärker von den

Oberflächeneigenschaften der Materialien abhängig als etwa die initiale Adhäsion. Auf allen Materialien verlief die initiale bakterielle Adhäsion wegen der ionischen Kraft von PBS ähnlich, so dass elektrostatische Kräfte der Materialoberfläche als nahezu unbedeutend diskutiert wurden [Gottenbos *et al.*, 2000]. Neuere Arbeiten erörtern ähnlich wie hier, dass der Parameter Hydrophobizität bei weitem nicht als einziger für die Interpretation der Stärke der Bakterienadhäsion hinreicht [Bürgers *et al.*, 2009; Hannig und Hannig, 2009; Hahnel *et al.*, 2010; Leyer, 2010]

5.4.2 Der Einfluss einer Beschichtung von Werkstoffoberflächen mit Speichel auf die Adhäsion von Mikroorganismen

Natürliche Oberflächen, dentale Restaurationen, aber auch alle anderen medizinischen Implantate stehen in Kontakt mit Körperflüssigkeiten und adsorbieren deshalb Proteine aus diesen Medien auf der Oberfläche. In der Zahnheilkunde bezeichnet man diesen dünnen Film aus Komponenten des Speichels als erworbenes Pellikel. Diese dünne Schicht kann Eigenschaften der reinen Oberflächen, einschließlich der Benetzbarkeit mit Wasser, überdecken. Dadurch und durch die direkte Interaktion von Speichelkomponenten mit Mikroorganismen selbst wird deren Adhäsion auf natürlichen und künstlichen Oberflächen verändert [Hannig und Hannig, 2009].

Die initiale bakterielle Adhäsion auf einer pellikelbeschichteten Oberfläche ist relativ schwach und reversibel. Die substratspezifischen Oberflächeneigenschaften werden bis zu einem gewissen Grad von dem entstandenen Pellikel in Abhängigkeit von dessen Dicke maskiert und nur die mittleren und weitreichenden Kräfte durch sie hindurch transferiert. Mit seiner Zusammensetzung, Rezeptoren, enzymatischer Aktivität, Scherkräften sowie entstehenden antibakteriellen Proteinen scheint das gebildete Pellikel verschiedenste Möglichkeiten zum weiteren Einfluss auf die bakterielle Adhäsion und die initiale Biofilmbildung zu haben. Zusätzlich erfolgt sein ständiger Auf-, Ab- und Umbau [Hannig und Hannig, 2009].

Für die Diskussion der initialen Adhäsion von *S. gordonii* DL1 auf Werkstoffoberflächen wurden in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Hydrophobizität der Oberflächen auch nach der Beschichtung mit Speichel sowie die Anwesenheit von Speichel *per se* betrachtet. Für alle Oberflächen wurde über einen weiten Bereich

von Netzwinkeln kein Zusammenhang zwischen dem physiko-chemischen Parameter der Hydrophobizität speichelbeschichteter Oberflächen und der Zahl adhärenter *S. gordonii* DL1 gefunden. Zu denselben Ergebnissen gelangten auch neuere Analysen der Adhäsion von Bakterien auf einer Reihe dentaler Komposite, einschließlich eines Silorans oder experimenteller Formulierungen von Dimethacrylaten [Hahnel *et al.*, 2008; Bürgers *et al.*, 2009]. Die Beschichtung von Oberflächen von Dentinadhäsiven mit Muzin hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Adhäsion von *S. mutans* [Leyer, 2010].

Andere Autoren analysierten das Alter der Pellikel oder Unterschiede der Adhäsion verschiedener Bakterienspezies. So wurde für die Adhäsion von *S. mitis* an Schmelz kein signifikanter Effekt eines Pellikels gefunden. Andererseits sollte die Adhäsion von *S. sanguis* und *S. mutans* an Schmelz bereits durch ein nur wenige Minuten altes Pellikel nahezu vollständig reduziert sein. Es wurde vermutet, dieses Pellikel würde die Eigenschaften der Oberflächen von Materialien maskieren und die Streptokokkenadhäsion stark verringern. Ein reifes Pellikel dagegen zeigte nahezu keine Wirkung auf die Bakterienadhäsion [Pratt-Terpstra *et al.*, 1989]. Für die Adhäsion verschiedener Streptokokkenspezies auf Keramikwerkstoffen war die frühe Bildung einer Plaque eher vom Pellikel selbst als von Materialeigenschaften abhängig. Bemerkenswert war die geringe Adhäsion von *S. mutans* und *S. sobrinus* verglichen mit *S. sanguinis* oder *S. oralis* [Meier *et al.*, 2008]. Nach künstlicher Alterung dentaler Komposite war die Adhäsion von *S. mutans* nach der Beschichtung der Oberflächen mit künstlichem Speichel sogar reduziert [Hahnel *et al.*, 2010]. Ähnliche Beobachtungen berichteten ebenfalls von einer reduzierten Adhäsion von *S. sanguis*, *S. salivarius* und *Actinomyces viscosus* an mit Speichel beschichteten Kompositen [Suljak *et al.*, 1995].

Die Beschichtung chemisch funktionalisierter Modelloberflächen mit Speichel wiederum führte zu einer gesteigerten Adhäsion von *S. gordonii* ganz unabhängig von der Art der Oberflächenmodifizierung [Müller *et al.*, 2007]. Diese Beobachtung ist bemerkenswert in Zusammenhang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. So führte die speichelbeschichtete Oberfläche des Glasionomerzements Ketac Molar zu einer vollständigen Benetzbarkeit mit Wasser und dennoch wurde dieselbe Zahl von Mikroorganismen wie auf der reinen Oberfläche nachgewiesen. Zur Erklärung dieser Beobachtung reicht die thermodynamische Theorie möglicherweise nicht mehr, auch wenn die Oberflächenenergie der reinen Oberfläche des Glasionomerzements mit

einem Netzwinkel gegen Wasser von etwa 40° hoch ist. Sie würde auch der früher formulierten Theorie widersprechen, der zufolge hydrophile Oberflächen resistent gegen die Adhäsion von Mikroorganismen sein sollten [Müller *et al.*, 2007]. *S. gordonii* wurde auch auf einer hydrophilen Oberfläche in fast derselben Menge gefunden, wie auf zwei chemisch verschiedenen, mit CH₃- oder CF₃-Gruppen funktionalisierten, stark hydrophoben Oberflächen [Müller *et al.*, 2007]. Wegen des fehlenden Zusammenhangs zwischen Netzwinkel und Zahl der Mikroorganismen darf man jedoch vermuten, dass spezifische Komponenten aus dem Speichel auf der Oberfläche des Glasionomerzements auch die initiale Adhäsion der Mikroorganismen fördern.

Diese spezifischen Komponenten oder Proteine sollten dann in etwa derselben Menge auf allen Oberflächen vorhanden sein, auch wenn die absoluten Proteinmengen unterschiedlich sind. Eine minimale Menge der spezifisch an *S. gordonii* bindenden Proteine sollte genügen, um maximale Sättigung der Bindung an *S. gordonii* zu erzielen. Diese maximale Sättigung mit *S. gordonii* für alle Werkstoffe würde den fehlenden Zusammenhang mit der Benetzbarkeit mit Wasser und der Gesamtproteinmenge erklären. Nur in diesem Sinne würde die Beschichtung mit Speichelproteinen eine Nivellierung der initialen Adhäsion von *S. gordonii* erzeugen. Die höhere Zahl der Mikroorganismen auf der reinen Oberfläche des Glasionomerzements Ketac Molar war auf der mit Speichel beschichteten Oberfläche reduziert. Umgekehrt stieg die ursprünglich kleinere Zellzahl auf den reinen, stark hydrophoben Oberflächen nach der Beschichtung mit Speichel. Diese Überlegungen würden nun lediglich für die initiale Adhäsion von *S. gordonii in vitro* gelten. Für den Verlauf der Bildung eines komplexen Biofilms *in vivo* sollten jedoch keine Prognosen abgeleitet werden. Dennoch könnte eine spezifische Bindung von *S. gordonii* an Speichelproteine die initiale Adhäsion fördern. So wurden auf der Oberfläche von *S. gordonii* DL1 mehrere Adhäesine beschrieben, die an Speichelproteine binden können, etwa das große serinreiche Protein HSA [Takahshi *et al.*, 2002]. Es ist außerdem bekannt, dass *S. sanguis*, *S. gordonii* oder *A. naeslundii* an spezifische Speichelkomponenten, wie etwa MG2 oder PRP-1, binden [Ruhl *et al.*, 2004]. MG2, ein Muzin, ist ein *low molecular weight mucin glycoprotein* mit O-glykosidischen und einem geringen Anteil an N-glykosidischen Bindungen. PRP-1 ist eines der prolinreichen Proteine (PRP) des Speichels [Scannapieco, 1994]. Ähnlich wie hier für den Glasionomerzement Ketac Molar beschrieben, förderte auch die Beschichtung einer

mit Polyethylenglykol (PEG) modifizierten hydrophilen Oberfläche, an die unbeschichtet wenige Zellen binden können, die Adhäsion von *S. gordonii*. Zu guter Letzt wurde nachgewiesen, dass dieser Bakterienstamm, anders als *S. mitis*, sehr stark an Speichel alleine binden kann [Müller *et al.*, 2007]. Aus diesen Beobachtungen darf man ableiten, dass die adsorbierten Proteine die ursprünglich reinen Oberflächen nicht unbedingt maskieren, sondern mit funktionellen Gruppen bereichern. Jedoch bestimmen wohl die in der jeweiligen Umgebung aktiven physikochemischen Eigenschaften der reinen Oberfläche Menge und Spektrum adsorbierter Proteine. Eine differenzielle Analyse des Spektrums der auf unterschiedlichen Oberflächen adsorbierten Proteine aus identischen physiologischen Flüssigkeiten, Speichel oder Serum, steht allerdings noch aus [Walz *et al.*, 2006].

5.4.3 Die Adhäsion von Mikroorganismen auf den Werkstoffen

Dentale Komposite auf Acrylatbasis

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Komposit TetricEvoCeram der Firma Ivoclar Vivadent ist ein Nanofüllerkomposit mit einer mittleren Partikelgröße von 550 nm. Dieser zahnfarbene, plastische Füllungswerkstoff wird ausschließlich im zahnmedizinischen Bereich verwendet. Aufgrund der Bestandteile seiner organischen Matrix wird dieses Material als hydrophob bezeichnet und steht so stellvertretend für die Klasse dentaler Komposite auf Acrylatbasis [Marxkors *et al.*, 2005].

Erste Analysen zur Adhäsion von Mikroorganismen an Kompositen zeigten für *S. sanguis* und *S. mutans* die Abhängigkeit der bakteriellen Adhäsion von Hydrophobizität und Zeta-Potential der verwendeten Materialien [Satou *et al.*, 1988]. Andere fanden an fließfähigen Kompositen, Microhybridkompositen, Glasionomerkompositen, einem Kompomer und einem Ormocer eine annähernd identische Adhäsion von *S. mutans*, mit Ausnahme des Ormocers. Daraus wurde gefolgert, dass bakterielle Adhäsion auch ohne spezifische Speichelproteine auftreten kann und demzufolge die verwendeten Materialien die Kolonisation beeinflussen können [Montanaro *et al.*, 2004].

Die Biofilmbildung auf Kompositen und Glasionomerkompositen wurde vielfach als negativer Vorgang beschrieben, welcher zur Zerstörung der Oberfläche dieser

Materialien führt. In dieser „Spirale“ fördert die Bakterienadhäsion die Bildung eines Biofilms mit fortschreitender Zerstörung des Materials und schlussendlich die Kariesentstehung. Mit der Adhäsion von *S. mutans* an Kompositen mit verschiedenen Füllstoffgrößen sollte die Rauigkeit der Oberflächen zunehmen, Füllstoffe modifiziert werden und die Mikrohärtigkeit geringer werden können. Außerdem sollte die Freisetzung von Kompositbestandteilen, vor allem Ethylenglycoldimethacrylat oder Triethylenglycoldimethacrylat, das Wachstum kariogener Bakterien fördern [Beyth *et al.*, 2008; Busscher *et al.*, 2010]. Antibakterielle Eigenschaften ließen sich über einen längeren Zeitraum nur bei Amalgam beobachten, während sie bei den Kompositen nur minimal auftraten. Komposite sollten im Vergleich zu Amalgam die Bildung eines Biofilms fördern [Beyth *et al.*, 2007].

Silorane

Silorane gehören ebenfalls zur Klasse der dentalen Komposite und basieren auf ringöffnenden Molekülen aus Siloxanen und Oxiranen. Die Siloxane bedingen dabei die Hydrophobizität des Werkstoffes [Palin *et al.*, 2005; Weinmann *et al.*, 2005]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die Berichte anderer Arbeitsgruppen zeigen in großer Übereinstimmung mit verschiedenen Bakterienspezies eine, verglichen mit herkömmlichen Kompositen, geringere Besiedlung der Oberfläche eines Werkstoffes auf der Basis von Siloranen. Bei hoher Hydrophobizität der Siloranoberfläche ist die Adhäsion von Bakterien auf der reinen Oberfläche gering [Bürgers *et al.*, 2009; Hahnel *et al.*, 2010]. Allerdings stieg hier die Zahl der adhärenen *S. gordonii*, wenn die Siloranoberfläche mit Speichel beschichtet wurde.

Glasionomerzemente

Glasionomerzemente (Polyalkenoatzemente, GIZ) werden heute nicht nur als Füllungsmaterialien verwendet, sondern eignen sich auch als Unterfüllungs- und Aufbauwerkstoff sowie zur Wurzelkanalfüllung und zur Befestigung von Kronen und Brücken. Zusätzlich finden sie gelegentlich Anwendung als Fissurenversiegler [Schmalz, 2005]. In der Arbeit wurde der hochvisköse, hydrophile Glasionomerzement Ketac Molar verwendet.

Die Bildung eines Biofilms erscheint, wie oben beschrieben, auf Glasionomerzementen als negativer Vorgang, der zur fortschreitenden Zerstörung der Material-

oberfläche, einer vermehrten Bakterienadhäsion und schließlich zur Entstehung von Karies führt. Durch die Freisetzung von Fluorid könnten GIZ jedoch die Bildung eines Biofilms beeinflussen. Fluoride dienen als Puffer zur Neutralisation von Säuren und hemmen das Wachstum von Bakterien. Allerdings wurde die Bildung eines Biofilms durch die Beschichtung eines GIZ mit Speichel nicht reduziert. Es wurde vermutet, dass Fluoride dann entweder keine dominante Rolle in der Biofilmbildung spielen oder aber ihre wirksame Konzentration nicht erreicht wurde [Busscher *et al.*, 2010].

Der Zusammenhang zwischen Rauigkeit, Plaque und bakterieller Adhäsion wurde mittels Adhäsion von *S. mutans* an konventionellen GIZ (Ketac Fil, Aqua Ionofil), kunststoff-modifizierten GIZ (Vitremmer), Compoglass, Dyract, Kompositen (darunter auch Tetric Ceram) und Empress-Keramik analysiert. Die meiste Plaque und die höchste Rauigkeit wurde bei den GIZ beobachtet, und Fluoride schienen auch hier keinen Einfluss auf Anlagerung und Lebensfähigkeit der Bakterien zu haben [Eick *et al.*, 2004]. Andererseits gibt es durchaus plausible Berichte über antibakterielle Eigenschaften von GIZ [da Silva *et al.*, 2007].

Silikone

Silikone sind wärmebeständig, hydrophob, also in wässriger Umgebung extrem schlecht benetzbar, und gelten als nicht gesundheitsschädlich. Daher werden sie vor allem für die Hautpflege und in der plastischen Chirurgie, aber auch für künstliche Herzklappen und Herzschrittmacher verwendet [Ratner *et al.*, 2004]. In der Zahnmedizin sind A- und K-Silikone für die exakte Abformung der Zähne zur Herstellung von Präzisionsmodellen wichtig [O'Brien, 2002].

Die Bildung eines Biofilms auf Silikon-basierten Implantaten ist eine häufige Ursache ihres Versagens und damit ein großes Problem in der Klinik. Anscheinend begünstigt die starke Hydrophobizität der Silikonoberfläche die Adhäsion von Bakterien vergesellschaftet mit Hefepilzen. Vor allem die Anwesenheit von *Rothia dentocariosa* und *S. aureus* im Biofilm scheint hier kritisch zu sein [Millsap *et al.*, 2001; Price *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2006].

Titan

Titan besitzt einen relativ geringen E-Modul, ist biokompatibel, durch die Ausbildung einer Sauerstoff-Inhibitionsschicht korrosionsbeständig und ist daher ein bevorzugtes Material beim Einsatz für orthopädische Prothesen. Vor allem auch in der

Zahnmedizin ist es ein über Jahrzehnte verwendetes (Implantat-)Material [Long und Rack, 1998; Cai *et al.*, 2003]. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Ti6Al4V wird typischerweise als Osseosyntheseimplantatmaterial oder als Verankerungskomponente von Prothesen gebraucht [Sulzer Medica/ Zimmer; 2001].

Es ist allerdings auch lange bekannt, dass Titan-basierte Implantate in der Mundhöhle mit oralen Mikroorganismen besiedelt werden [Baffone *et al.*, 2011]. Für die bakterielle Adhäsion an leitfähigen Materialien ist möglicherweise ein Elektronentransfer wesentlich, denn es entsteht ein elektrostatisches Feld, wenn sich ein Bakterium mit negativer Oberfläche einem leitfähigen Material annähert [Busscher *et al.*, 2010].

In einer vergleichenden Untersuchung wurde die Adsorption von Speichel- und Serum-Proteinen und die anschließende Adhäsion von *S. mutans* und *Actinomyces naeslundii* an Titan, Zirkonoxid-Keramik und Hydroxylapatit geprüft. Dabei adhärten auf unbeschichteten Materialien mehr *S. mutans* und weniger *Actinomyces naeslundii* an Titan und der Keramik als an Hydroxylapatit. In Anwesenheit eines Speichel- oder Serum-Pellicels wurde die Adhäsion von *S. mutans* an Titan und Zirkonoxid stark reduziert [Lima *et al.*, 2008]. Jedoch wurden *in vivo* keine Unterschiede in der Bildung eines Biofilms an Titan, Amalgam oder Hydroxylapatit gefunden [Leonhardt *et al.*, 1995]. Andere Autoren wiederum berichteten von Unterschieden in der Adhäsion von Bakterien an Titan, TiN oder ZrN [Groessner-Schreiber *et al.*, 2004].

Zur Verbesserung der Osseointegration von Titan-basierten Implantaten wurde versucht, die Rauigkeit der Oberflächen zu erhöhen, ein Verfahren das allerdings auch zu einer noch höheren Besiedlung der Oberfläche mit oralen Mikroorganismen führen könnte. Daher sollten Titanoberflächen, welche der Mundhöhle ausgesetzt sind, immer hochglanzpoliert sein [Bürgers *et al.*, 2010]. Titan erlaubt in der vorliegenden Arbeit die Adhäsion von *S. gordonii* DL1. Weil Titan *per se* kein Metall mit antibakteriellen Eigenschaften ist, wurde auch verschiedentlich versucht, über geeignete chemische Modifikationen bakterienabweisende Oberflächen zu erzeugen. Am meisten Aussicht auf Erfolg scheint die Veränderung mit PEG (Polyethylenglykol) oder anderen funktionellen Gruppen zu haben. Eine kurze Behandlung der Titanoberflächen mit UV-Licht förderte anscheinend lediglich die Osseointegration [Hu *et al.*, 2010; Khoo *et al.*, 2010; Yasuyuki *et al.*, 2010].

Cobalt-Chrom-Molybdän

In der Zahnheilkunde werden Cobalt-Chrom-Molybdän-Legierungen aufgrund ihres hohen E-Moduls und ihrer hervorragenden Korrosionsbeständigkeit hauptsächlich innerhalb der Modellgussprothetik für die Herstellung von Einstückgussprothesen verwendet. In der Humanmedizin finden sie dagegen schon seit Jahrzehnten vor allem in der Unfallchirurgie und als Implantatwerkstoff ihre Anwendung [Eichner *et al.*, 2000; Reclaru *et al.*, 2005].

Metalllegierungen sind nicht biologisch inert, weil sie Metallpartikel erzeugen, die auf benachbarte Gewebe einwirken können und die in Körperflüssigkeiten nachweisbar sind. Metalle korrodieren und auf diese Weise steigt die Konzentration von Metallionen in Geweben. Zudem wird beispielsweise Cobalt-Chrom nur sehr langsam aus dem Körper entfernt [Schaffer *et al.*, 1999; Witzleb *et al.*, 2006]. Darüber hinaus wirken hohe Konzentrationen von Co und Cr im Serum möglicherweise toxisch [Evans und Benjamin, 1987; Hallab *et al.*, 2001; Ladon *et al.*, 2004]. Außerdem werden Oberflächen metallischer Implantate relativ häufig von Bakterien besiedelt, die schließlich einen kompakten Biofilm bilden können [Neut *et al.*, 2003; Rafiq *et al.*, 2006]. Co-Cr kann dieser Entwicklung lediglich entgegenwirken, sie aber nicht vollständig verhindern [Hosman *et al.*, 2009]. Ähnlich wie mit dem statischen System zur Analyse der initialen Adhäsion in der vorliegenden Arbeit wurde auch in einer Fließkammer nach längerer Inkubation mit CoCrMo und Titan kein Unterschied in der Besiedlung der Oberflächen mit *S. mutans* gefunden. Allerdings waren die Zellzahlen auf den Metalloberflächen, wahrscheinlich wegen der längeren Inkubationszeit, wesentlich geringer als auf Kompositoberflächen [Rosentritt *et al.*, 2008].

Polymethylmethacrylat

Polymethylmethacrylat (PMMA) gehört wie Polyethylen (PE) und Polytetrafluorethylen (PTFE) zu den hydrophoben Materialien. PMMA wird in der Zahnheilkunde hauptsächlich zur Herstellung von Prothesen und kieferorthopädischen Apparaturen, aber auch als Beschichtungsmaterial für Gipsmodelle verwendet [Eichner *et al.*, 2000]. In der Medizin wird es unter anderem als Knochenzement für orthopädische Implantate eingesetzt, es ist aber auch wegen seiner hohen Stabilität und Lichtdurchlässigkeit ein geeignetes Material für intraoculäre Linsen [Gottenbos *et al.*, 2002].

Obwohl an PMMA-Oberflächen auch Bakterien adhären, ist die Anlagerung verschiedener *Candida*-Spezies eines der Hauptprobleme ihrer klinischen Anwendung. *Candida albicans* gilt als häufigster Besiedler und wird meist in einem gemischten Biofilm vergesellschaftet mit Streptokokken-, *Veilonellen*-, *Lactobacillen*-, *Prevotella*- und *Actinomyces*-Spezies entdeckt [Millsap *et al.*, 1999; Rinastiti *et al.*, 2010]. Möglicherweise fördert die bakterielle Adhäsion die Anlagerung von *Candida*, da Bakterien bereits früh auf PMMA-Oberflächen nachgewiesen wurden, die Besiedlung mit *Candida* allerdings erst nach Tagen. Unterschiedlich wird der Einfluss der Rauigkeit des Materials auf die Adhäsion von *C. albicans* interpretiert [Gottenbos *et al.*, 2003; Hahnel *et al.*, 2009].

Für die Adhäsion von Bakterien auf PMMA *in vivo* ist möglicherweise die Ladung der Oberfläche ein entscheidender Parameter. Während auf etwa der Hälfte der positiv geladenen Flächen keine *E. coli* gefunden wurden, waren die negativ geladenen Oberflächen mit *E. coli* besiedelt. Mit *P. aeruginosa* wurde dieser Unterschied jedoch nicht nachgewiesen [Gottenbos *et al.*, 2003]. *In vitro* wurde, stellvertretend für viele ähnliche Analysen, eine rasche Adhäsion einer PMMA-Oberfläche mit *S. epidermidis* und *P. aeruginosa* AK1 bereits nach einer Stunde ermittelt. Bemerkenswert hier war der große Unterschied in der initialen Adhäsion der verschiedenen Bakterienstämme und die relativ geringen Unterschiede auf den unterschiedlichen Materialoberflächen. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit war die Adhäsion auf den hydrophoben PMMA- und PE-Oberflächen in etwa gleich [Gottenbos *et al.*, 2000].

Polyethylen

Im medizinischen Bereich wird Polyethylen (PE) unter anderem zur Herstellung von Implantaten wie etwa Rückenmarksflüssigkeitshunts oder orthopädische Prothesen verwendet [Gottenbos *et al.*, 2003]. Im zahnmedizinischen Bereich findet PE momentan keine relevante klinische Verwendung [Ludwig *et al.*, 2005].

In einer repräsentativen Analyse wurde die initiale Adhäsion und das Oberflächenwachstum von *S. epidermidis* und *P. aeruginosa* an biomedizinischen Polymeren wie PMMA, PTFE, PE, Poly(dimethylsiloxan), Poly(ethylenterephthalat), Polypropylen und Polyurethan untersucht. Dabei wurde eine sehr schnelle initiale Adhäsion von *S. epidermidis*, verglichen mit *P. aeruginosa*, beobachtet. Interessanterweise gab es zwischen den einzelnen Materialien, wieder ähnlich den hier erzielten Ergebnissen, nahezu keine Unterschiede. Besonders wenig *P. aeruginosa* wurde an PTFE

gefunden. Während die initiale bakterielle Adhäsion wahrscheinlich wegen der Ionenstärke des PBS relativ ähnlich verlief, wurde das Wachstum der Bakterien auf den Oberflächen unter anderem abhängig von physikalisch-chemischen Wechselwirkungen zwischen Nährstoffangebot, Bakterien und der Materialoberfläche diskutiert. Für PTFE, PMMA und PE wurde auch nach längeren Inkubationszeiten eine ähnliche Entwicklung eines Biofilms berichtet [Gottenbos *et al.*, 2000].

Polytetrafluorethylen

Polytetrafluorethylen (PTFE), Teflon, ist ein lineares, nicht verzweigtes, teilkristallines Polymer aus Kohlenstoff und Fluor und gehört zur Klasse der Polyhalogenolefine [Eichner *et al.*, 2000]. PTFE ist sehr reaktionsträge und ist wegen seiner extrem niedrigen Oberflächenspannung sehr hydrophob [Ratner *et al.*, 2004]. In der Medizin wird PTFE unter anderem für Gefäßprothesen, arterielle Shunts, intravasculäre Geräte oder auch abdominelle Prothesen verwendet [Gottenbos *et al.*, 2002].

Prothesen aus Polytetrafluorethylen werden sehr leicht von pathogenen Keimen wie *S. aureus* oder *S. epidermidis* besiedelt. Man nimmt an, dass diese Organismen die Implantate kolonisieren, indem sie an Proteine auf der Oberfläche des Werkstoffes binden und dort einen Biofilm bilden [Gotz, 2002; Matl *et al.*, 2008]. Es wurde auch berichtet, dass *Enterococcus faecalis* auf der PTFE-Oberfläche in deutlich geringerer Menge adhärierte, als auf anderen Kunststoffen, wie Polyurethan oder Polyamid und auch leichter zu entfernen war [Senechal *et al.*, 2004]. In der vorliegenden Arbeit adhärierte *S. gordonii* in etwa in dem Maße auf PTFE wie auf dem vergleichbar hydrophoben Silikon, aber stärker als auf dem Siloran. In Anwesenheit von Speichel wurden signifikant mehr Zellen auf PTFE nachgewiesen als auf dem reinen Material. In einer vergleichbaren Analyse adhärierten Streptokokken an Teflon in deutlich geringeren Mengen als an natürlichem Schmelz. Bei vorheriger, nur kurzzeitiger, Beschichtung mit Speichel war die Menge der initial adhärenenten Bakterien zum einen stark reduziert und zum anderen waren, genau wie in der vorliegenden Arbeit, die Unterschiede der Zellzahlen auf den unterschiedlichen Oberflächen aufgehoben. Eine Beschichtung der Teflonoberfläche mit Speichel über zwei Stunden wirkte auf die verschiedenen Bakterienstämme wieder unterschiedlich, denn nun adhärierte *S. mutans* besser als *S. sanguis* oder *S. mitis* [Pratt-Terpstra *et al.*, 1989]. Momentan richtet sich das Forschungsinteresse darauf, auch für die PTFE-Oberfläche antibakterielle Modifikationen zu entwickeln [Matl *et al.*, 2008].

5.5 Ausblick: Materialien mit antibakteriellen Eigenschaften

Die Vermeidung der Adhäsion von Mikroorganismen und der Bildung eines Biofilms ist ein wesentlicher Aspekt in der Entwicklung neuer Materialien für die Anwendung in der Medizin. Wünschenswert wäre, dass Biomaterialien bereits die unspezifische Adsorption von Proteinen und in der Folge die Adhäsion von Mikroorganismen verhindern, aber gleichzeitig selektiv die Adhäsion von gewebespezifischen Zielzellen erlauben. Dazu wurden verschiedene Strategien vorgeschlagen [Harris und Richards, 2006; Maddikeri *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2008].

Eine häufig vorgeschlagene Möglichkeit ist die Beschichtung von Oberflächen mit Antibiotika. So wurde beispielsweise eine Membran aus Polybutylmethacrylat mit dem Antibiotikum Ciprofloxacin beschichtet und so die Anlagerung und das Wachstum von *S. epidermidis* und *P. aeruginosa* für kurze Zeit verhindert [Liu *et al.*, 2008]. Jedoch wurde in zahlreichen anderen Untersuchungen festgestellt, dass die Freisetzung von antimikrobiellen Substanzen aus einem Material auch Nachteile besitzt. So wurde beispielsweise die kurze Effektivität und eine mögliche Toxizität gegenüber umgebenden Materialien diskutiert. Daher sollten Bakterizide idealerweise im Material stabil integriert sein, um so unerwünschte Nebeneffekte zu verhindern, ohne die antibakterielle Aktivität zu verlieren. Allerdings haben solche Materialien im Vergleich zu freien Bakteriziden eine schwächere antibakterielle Wirkung. Außerdem muss darauf geachtet werden, dass die integrierten Bakterizide biokompatibel sind und die mechanischen Eigenschaften des Materials nicht verändern [Liu *et al.*, 2008; Namba *et al.*, 2009]. Die Verwendung von Silberionen wurde als Mittel vor allem gegen antibiotikaresistente Bakterien versucht. So wurde berichtet, dass bereits geringe Konzentrationen von Silberionen die Adhäsion von *S. epidermidis* über längere Zeit inhibierten. Die toxische Wirkung von Silberionen in eukaryontischen Zellen bleibt jedoch zu bedenken [Liu *et al.*, 2008].

Eine Alternative zur Vermeidung von mikrobieller Adhäsion ist die Funktionalisierung des implantierten Materials mit antimikrobiellen Wirkstoffen. So wurden beispielsweise Titan-Oberflächen mit Poly(L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) (PLL-g-PEG) beschichtet, die selbst wieder Bioliganden, wie etwa RGD (Arg-Gly-Asp)-Sequenzen, tragen sollten. Die Adhäsion von *S. epidermidis*, *S. mutans* und *P. aeruginosa* an diesen Oberflächen war, abhängig vom Bakterientyp, um etwa 90% geringer als an unbeschichteten Oberflächen. Eukaryontische Zellen hingegen

konnten adhäreren [Maddikeri *et al.*, 2008]. Modelloberflächen, etwa Siliziumwafer, die unabhängig von spezifischen Werkstoffen kontrolliert chemisch funktionalisiert werden können, eignen sich besonders gut für das Studium der Kräfte der initialen Adhäsion. Auch in diesem Bereich wurde mit PEG-modifizierten Oberflächen eine sehr geringe Adhäsion von Bakterien beobachtet, die jedoch die Adhäsion und Proliferation von Osteoblasten erlaubte [Müller *et al.*, 2008].

Es wurde auch versucht, in dentale Komposite die antiseptische, quartäre Ammoniumverbindung Cetylpyridiniumchlorid (CPC) zu polymerisieren. Auf Oberflächen mit 3% CPC-Anteil adhärten über eine längere Zeit signifikant weniger Bakterien [Namba *et al.*, 2009]. Ein alternativ modifiziertes Komposit wurde mit Methacryloyloxydodecylpyridiniumbromid (MDPB), einem kationischen, bakterienabweisenden Monomer, als Bestandteil der organischen Matrix, hergestellt. Auf dieser Materialoberfläche war das Wachstum einer Plaque reduziert [Ebi *et al.*, 2001]. Es wurde auch berichtet, ein mit MDPB modifiziertes Komposit würde die Adhäsion von *S. mutans* ohne Freisetzung der antibakteriellen Komponenten vollständig hemmen [Imazato *et al.*, 2003]. Die kovalente Immobilisierung von MDPB auf einem Siliziumwafer als Modelloberfläche reduzierte, im Unterschied zu einer mit PEG modifizierten Oberfläche, die Adhäsion von *S. gordonii* und *S. mutans* nicht. Allerdings waren die meisten Bakterien an der reinen kationischen Oberfläche nicht vital. Die Vitalität der Bakterien stieg allerdings signifikant nach der Beschichtung der Oberflächen mit Speichel. Erst die Verbindung einer PEG-modifizierten Oberfläche mit kationischen Gruppen sollte zuverlässig die Adhäsion von Bakterien reduzieren können [Müller *et al.*, 2009].

5.6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit sollte die initiale Adhäsion von *S. gordonii* DL1 auf medizinischen und zahnmedizinischen Biomaterialien analysiert werden. Die Ausbildung eines Biofilms sollte jedoch nicht untersucht oder prognostiziert werden. Von besonderem Interesse war, ob für die initiale Adhäsion die Hydrophobizität der reinen Materialoberflächen relevant ist. Weil natürliche und künstliche Oberflächen in der Mundhöhle rasch von Speichel bedeckt werden, sollte außerdem der Einfluss der

Hydrophobizität beschichteter Oberflächen auf die Adhäsion von *S. gordonii* DL1 analysiert werden.

Ein Einfluss einer Proteinbeschichtung auf den Netzwinkel an Oberflächen war nicht immer eindeutig. Die meisten der als hydrophob detektierten Oberflächen waren zwar nach der Beschichtung mit humanem Speichel hydrophiler, andererseits blieb der Netzwinkel für die hydrophoben Oberflächen PE (Polyethylen) und Silikon auch nach dieser Beschichtung gleich hoch. Bemerkenswert war auch, dass die hydrophile Oberfläche des Glasionomerzements Ketac Molar nach der Beschichtung mit humanem Speichel vollständig mit Wasser benetzbar wurde. Lineare Regressionsanalysen zeigten außerdem über einen weiten Bereich der Hydrophobizität der Materialoberflächen einen negativen Zusammenhang zwischen der Adhäsion von *S. gordonii* und der Hydrophobizität der Materialoberflächen. Im Unterschied zu den unbeschichteten Oberflächen gab es diesen Zusammenhang auf den mit humanem Speichel beschichteten Oberflächen nicht. Außerdem war ein Zusammenhang zwischen der Zahl der Bakterien und der auf den Oberflächen detektierten Proteinmengen ebenfalls nicht nachzuweisen.

Der negative Zusammenhang zwischen den Netzwinkeln und der Adhäsion von *S. gordonii* auf den reinen Oberflächen war so nicht unbedingt zu erwarten. Nach der thermodynamischen Theorie würde man vermuten, die als hydrophob beschriebene Oberfläche von *S. gordonii* adhärierte stärker an den hydrophoben Oberflächen. Weniger Zellen sollten sich an die hydrophile Oberfläche des Glasionomerzements anlagern. Allerdings sollten die hier ermittelten Zellzahlen die für die unmittelbare und initiale Adhäsion physiko-chemisch relevanten Kräfte widerspiegeln. Durch das Fehlen der Speichelproteine wirken ausschließlich die über die Ionen der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) vermittelten chemischen Funktionalitäten an den Oberflächen von *S. gordonii* und der Werkstoffe. Daher ist es durchaus möglich, dass Ionenladungen auf der Oberfläche des Glasionomerzements, vermittelt über die Ionen des Puffers auf geladene Gruppen der Oberfläche von *S. gordonii*, elektrostatisch wirken können. Damit wäre weniger die Hydrophobizität von Oberflächen für die initiale Adhäsion bedeutsam, sondern die Art der chemischen Gruppen an den Grenzflächen, die diese Benetzbarkeit mit Wasser erzeugen. Um diese Hypothese zu bearbeiten, sollten Analysen mit sehr viel mehr Oberflächen derselben Benetzbarkeit durchgeführt werden, die allerdings auf unterschiedlicher chemischer Funktionalität basieren. Auch die hier erzielten Ergebnisse mit Filtek

Siloran unterstützen diese neue Arbeitshypothese der Bedeutung der chemischen Funktionalität, weil speziell die hohe Hydrophobizität dieser Oberflächen eine relativ geringe Bakterienadhäsion erlaubte, während eine viel größere Zellzahl an ähnlich hydrophoben Oberflächen adhärierte.

Wenn die Zahl der adhärierten *S. gordonii* unabhängig ist vom Netzwinkel der Oberflächen nach der Beschichtung mit Speichelproteinen und gleichzeitig die Menge der adsorbierten Proteine keine Rolle spielt, sollten spezifische Bindungen an bestimmte Speichelproteine entscheidend sein. Zumindest dieselbe Menge dieser Proteine sollte auf den chemisch verschiedenen Oberflächen vorhanden sein oder eine minimale Menge davon würde ausreichen, um maximale Sättigung mit *S. gordonii* zu erzielen. Nur in diesem Sinne erzeugt die Beschichtung mit Speichelproteinen eine Nivellierung der initialen Adhäsion mit *S. gordonii*. Der Verlauf der Bildung eines Biofilms ist damit nicht vorgezeichnet. Diese Hypothese würde bedeuten, man könnte auf allen möglichen Oberflächen in etwa die gleiche initiale Zahl *S. gordonii* prognostizieren, wenn man diese Oberflächen vorher mit Speichel beschichtet hat.

Man sollte des weiteren für die Charakterisierung der Adhäsion von Bakterien zwingend unterscheiden zwischen der Adhäsion an Systemen in biologischer oder physiologischer Umgebung und derjenigen in nicht-biologischen Systemen. Die initiale Adhäsion in einem nicht-biologischen System oder an reine Oberflächen würde nur von den chemischen Gruppen an den Grenzflächen hydrophiler oder hydrophober Medien beherrscht werden. An bakterienabweisenden Oberflächen sollte bereits diese erste Phase der Annäherung der beiden Grenzflächen nicht möglich sein.

Für die Adhäsion an Oberflächen in physiologischer Umgebung hingegen würde man zwei Zustände unterscheiden müssen. Zum einen würde die initiale reversible Adhäsion oder Annäherung von physiko-chemischen Parametern bestimmt werden. Andererseits sollte eine feste reversible Bindung erst über funktionelle Gruppen spezifischer Proteine des Speichels, beispielsweise Muzine oder CSP-1 (common salivary protein-1) und Rezeptoren oder Adhäsinen auf Oberflächen von Bakterien entstehen. Die protein-chemische Analyse des Spektrums adsorbierter Proteine an unterschiedlichen Oberflächen würde helfen, diese Hypothese experimentell zu bearbeiten.

6. Zusammenfassung

Der klinische Erfolg oder Misserfolg medizinischer und zahnmedizinischer Biomaterialien hängt zu einem wesentlichen Teil von der Adhäsion von Bakterien und eukaryontischen Zellen auf den Oberflächen dieser Werkstoffe ab. Mit entscheidend dafür ist wiederum die Adsorption von Proteinen aus dem umgebenden Milieu, die ihrerseits die Adhäsion von Bakterien und Zellen beeinflussen kann. Bioadhäsion an Werkstoffoberflächen ist ein sehr komplexes Geschehen und abhängig von vielen Faktoren. So werden etwa physikalisch-chemische Eigenschaften wie die Hydrophobizität einer Oberfläche und die Adsorption von Speichelproteinen speziell auf zahnmedizinischen Werkstoffen in der Mundhöhle in der Literatur diskutiert.

Ziel dieser Arbeit war die Quantifizierung der Adhäsion des oralen Mikroorganismus *Streptococcus gordonii* DL1 auf zahnmedizinischen Werkstoffen und solchen, die darüber hinaus auch in der Medizin verwendet werden. Dazu wurde die Zahl von *S. gordonii* DL1 auf Biomaterialien in Phosphatpuffer (PBS) oder nach Beschichtung mit humanem Speichel bestimmt. Außerdem wurden Korrelationsanalysen zwischen der Zahl adhärenter Bakterien, der Menge an Proteinen auf den Werkstoffoberflächen sowie der Hydrophilie der Oberflächen durchgeführt.

Es wurden die Metalllegierungen Ti6Al4V und Co28Cr6Mo, die dentalen Komposite TetricEvoCeram und Filtek Siloran, die Kunststoffe Polymethylmethacrylat (PMMA), Polytetrafluorethylen (PTFE) und Polyethylen (PE) sowie der Glasionomerzement Ketac Molar untersucht. Von diesen Werkstoffen wurden materialspezifisch Prüfkörper mit einem Durchmesser von 11,3 mm und einer Höhe von 2 mm hergestellt.

Zur Bestimmung der Hydrophobizität der Oberflächen wurde der Netzwinkel gegen Wasser bestimmt. Materialien mit Netzwinkeln zwischen 90,5° und 105,5° nach Beschichtung mit PBS wurden als stark hydrophob (PTFE, PE und Silikon) und solche mit Netzwinkeln zwischen 61,75° (PMMA) und 79,25° (Filtek Siloran) als schwach hydrophob (PMMA, Filtek Siloran, TetricEvoCeram, Titan und CoCrMo) klassifiziert. Der Glasionomerzement (Ketac Molar) mit einem Netzwinkel von 39,25° wurde als hydrophile Oberfläche betrachtet. Die Beschichtung mit humanem Speichel hatte für einige Oberflächen (Titan, CoCrMo, Filtek Siloran, PMMA) eine

Reduktion des Netzwinkels und damit eine Steigerung der Hydrophilie zur Folge. Für andere Prüfkörper (PTFE, PE, Silikon, TetricEvoCeram) blieben die Netzwinkel nach Speichelbeschichtung unverändert hoch, während beim Glasionomerkement Ketac Molar ein Netzwinkel gegen Wasser nicht mehr messbar war.

Für die Bestimmung der Zahl an Bakterien auf den Prüfkörpern wurden diese zunächst einzeln in einer Wellplatte mit Speichel oder PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen in PBS wurden die Prüfkörper mit einer biotinylierten Bakteriensuspension für eine Stunde im Kühlschrank inkubiert. Adhärente Mikroorganismen auf den Materialoberflächen wurden schließlich über eine Biotin-Avidin-gekoppelte Reaktion indirekt anhand von Signalen auf lichtempfindlichen Filmen detektiert. Die mit bekannten Zahlen von Bakterien auf Nitrozellulosemembranen im dot blot-Verfahren erstellten Eichkurven erlaubten über den Vergleich der Signalintensitäten die quantitative Bestimmung der Bakterien auf den Oberflächen von Prüfkörpern.

S. gordonii adhärierte in unterschiedlichen Zellzahlen an den verschiedenen Biomaterialien. Selbst für ein identisches Material gab es Unterschiede in Abhängigkeit von der Beschichtung mit PBS oder humanem Speichel. Dabei wurden die höchsten Zellzahlen mit etwa $3,2 \times 10^4$ KBE/mm² auf Ketac Molar nach Beschichtung mit Speichel gemessen, die niedrigsten Zellzahlen wurden mit etwa 4×10^3 KBE/mm² auf Filtek Siloran mit PBS-Beschichtung gefunden. Auffällig ist, dass mit Speichel als Beschichtung der Materialoberflächen verglichen mit PBS eine leichte Erhöhung der Adhäsion der Bakterien auf den Materialien Teflon, Polyethylen, PMMA, Silikon, TetricEvoCeram und Ketac Molar zu beobachten war. Auf Filtek Siloran dagegen wurden nach der Beschichtung mit humanem Speichel signifikant mehr Bakterien ermittelt als nach Beschichtung mit PBS. Auch auf den metallischen Prüfkörpern waren die Unterschiede der Bakterienzahlen abhängig von der Beschichtung signifikant, hier wurden allerdings auf den mit Speichel beschichteten Oberflächen weniger Bakterien gefunden als auf den mit PBS vorbehandelten Materialien. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien über die gesamten unterschiedlichen Oberflächen. Lineare Regressionsanalysen zwischen steigenden Netzwinkeln auf Werkstoffoberflächen ohne Beschichtung mit humanem Speichel und adhärenen *S. gordonii* DL1 ließen eine schwach negative Korrelation erkennen. Dieser Zusammenhang war auf den mit humanem Speichel beschichteten Oberflächen nicht nachzuweisen. Außerdem hatte

die Proteinmenge des Speichels per se keinen Einfluss auf die Zahl adhärenter Zellen.

Die hier erzielten Ergebnisse und die Diskussion der Bakterienadhäsion an unterschiedlichen Biomaterialien verweisen somit auf einen sehr komplexen Vorgang, welcher allein durch die hier untersuchten Parameter, nämlich Hydrophobizität und Proteinabsorption, nicht zu erklären ist. Andere Faktoren, wie funktionale chemische Gruppen an Grenzflächen, Ionen und Ionenstärke, oder eine spezifische Bindung an Speichelproteine spielen auch eine entscheidende Rolle dabei. Um diese verschiedenen Einflüsse zu untersuchen, sollten weiterführende Analysen mit sehr viel mehr Oberflächen mit entsprechenden Modifizierungen oder Inkubationsbedingungen durchgeführt werden. Des weiteren sollte für die Charakterisierung der Adhäsion von Bakterien auf Biomaterialien unbedingt zwischen der Adhäsion an Systemen *in vivo* und der Adhäsion an Systemen, die *in vitro* stattfinden, unterschieden werden.

7. Literaturverzeichnis

Absolom DR, Lamberti FV, Polivoca Z, Zingg W, van Oss CJ, Neumann AW. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl Environ Microbiol* 1983; 46:90-97.

Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Auschill TM, Follo M, Braun G, Hellwig E, Arweiler NB. Effects of commonly used food preservatives on biofilm formation of *Streptococcus mutans* in vitro. *Arch Oral Biol* 2008; 53:765-772.

An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res* 1998; 43:338-348.

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

Baffone W, Sorgente G, Campana R, Patrone V, Sisti D, Falcioni T. Comparative effect of chlorhexidine and some mouthrinses on bacterial biofilm formation on titanium surface. *Curr Microbiol* 2011; 62:445-451.

Bakker DP, Postmus BR, Busscher HJ, van der Mei HC. Bacterial strains isolated from different niches can exhibit different patterns of adhesion to substrata. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70:3758-3760.

Beyth N, Dombb AJ., Weiss EI. An in vitro quantitative antibacterial analysis of amalgam and composite resins. *J Dent* 2007; 35:201-206.

Beyth N, Bahir R, Matalon S, Domb AJ, Weiss EI. *Streptococcus mutans* biofilm changes surface-topography of resin composites. *Dent Mater* 2008; 24: 732-736.

Boks NP, Busscher HJ, van der Mei HC, Norde W. Bond-strengthening in *Staphylococcal* adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces using atomic force microscopy. *Langmuir* 2008; 24:12990-12994.

Boks NP, Norde W, van der Mei HC, Busscher HJ. Forces involved in bacterial adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Microbiol* 2008; 154:3122-3133.

- Bürgers R, Cariaga T, Müller R, Rosentritt M, Reischl U, Handel G, Hahnel S. Effects of aging on surface properties and adhesion of *Streptococcus mutans* on various fissure sealants. *Clin Oral Invest* 2009; 13:419-426.
- Bürgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Impl Res* 2010; 21:156-164.
- Bürgers R, Schneider-Brachert W, Hahnel S, Rosentritt M, Handel G. Streptococcal adhesion to novel low-shrink silorane-based restorative. *Dent Mater* 2009; 25:269-275.
- Burkhardt F, Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P (Hrsg.). Mikrobiologische Diagnostik, Bakteriologie Mykologie Virologie Parasitologie Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 2. Auflage, 2009.
- Busscher H, Sjoelma J, van der Mei HC. Relative importance of surface free energy as a measure of hydrophobicity in bacterial adhesion to solid surfaces. In: Doyle RJ, Rosenberg M (eds) *Microbial cell surface hydrophobicity*. American Society for Microbiology, Washington DC (1990); 335-359.
- Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dent Res* 2010; 89:657.
- 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.
- Cai Z, Shafer T, Watanabe I, Nunn ME, Okabe T. Electrochemical characterization of cast titanium alloys. *Biomaterials* 2003; 24:213-218.
- Carl U. Proteinadsorption an Biomaterialien. 2010, Dissertation, Universität Regensburg.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284:1318-1322.
- Craig RG, Powers JM, Wataha JC. Zahnärztliche Werkstoffe, Eigenschaften und Verarbeitung, Elsevier GmbH, Urban und Fischer Verlag, München, 1. Auflage, 2006.

- da Silva RC, Zuanon ACC, Spolidorio DMP, Campos JALB. Antibacterial activity of four glass ionomer cements used in atraumatic restorative treatment. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18:1859-1862.
- Dorner S. Quantifizierung der Speichelproteinadsorption an zahnärztlichen Werkstoffoberflächen. 2005, Dissertation, Universität Regensburg.
- do Serro APVA, Fernandes AC, Saramago BdJV, Norde W. Bovine Serum albumin adsorption on titania surfaces and its relation to wettability aspects. *J Biomed Mater Res* 1999; 46: 376-381.
- 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.
- Eichner K, Kappert HF. Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung, Hüthig Verlag, Heidelberg, 1996.
- Eichner K, Kappert HF. Zahnärztliche Werkstoffe und ihre Verarbeitung; Band 1: Grundlagen und Verarbeitung; 7. Auflage. Georg Thieme Verlag, 2000.
- Eick JD, Kotha SP, Chappelow CC, Kilway KV, Giese GJ, Glaros AG, Pinzino CS. Properties of silorane-based dental resins and composites containing a stress-reducing monomer. *Dent Mater* 2007; 23:1011-1017.
- Eick S, Glockmann E, Brandl B, Pfister W. Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system. *J Oral Rehab* 2004; 31:278-285.
- Evans EJ, Benjamin M. The effect of grinding conditions on the toxicity of cobalt-chrome-molybdenum particles in vitro. *Biomaterials* 1987; 8:377-384.
- Forsten L. Fluoride release and uptake by glass-ionomers and related materials and Its clinical effect. *Biomaterials* 1998; 19:503-508.
- Frandsen EVG, Pedrazzoli V, Kilian M. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6:129-133.
- Geckeler KE, Rupp F, Geis-Gerstorfer J. Interfaces and interphases in (bio)materials: definitions, structures, and dynamics. *Adv Mater* 1997; 9:513-518.

- Gibbons RJ, Etherden I, Moreno EC. Contribution of stereochemical interactions in the adhesion of *Streptococcus sanguis* C5 to experimental pellicles. J Dent Res 1985; 64:96-101.
- Gibbons RJ, Etherden I, Skobe Z. Association of fimbriae with the hydrophobicity of *Streptococcus sanguis* FC-1 and adherence to salivary pellicles. Infect Immun 1983; 41:414-417.
- Gottenbos B, Busscher HJ, van der Mei HC. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. J Mater Sci Mater Med 2002; 13:717-722.
- Gottenbos B, van der Mei HC, Busscher HJ. Initial adhesion and surface growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on biomedical polymers. J Biomed Mater Res 2000; 50:208-214.
- Gottenbos B, van der Mei HC, Klatter F, Grijpma DW, Feijen J, Nieuwenhuis P, Busscher HJ. Positively charged biomaterials exert antimicrobial effects on gram-negative bacilli in rats. Biomaterials 2003; 24:2707-2710.
- Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. Mol Microbiol 2002; 43:1367-1378.
- Groessner-Schreiber B, Hannig M, Dück A, Griepentrog M, Wenderoth DF. Do different implant surfaces exposed in the oral cavity of humans show different biofilm compositions and activities? Eur J Oral Sci 2004; 112:516-522.
- Guggenberger R, Weinmann W, Kappler O, Fundingsland J, Thalacker C. Historical evolution of volumetric polymerization shrinkage of restorative composites. J Dent Res 2007; 403.
- Guggenberger R, May R, Stefan KP. New trends in glass-ionomer chemistry. Biomaterials 1998; 19:479-483.
- Hahnel S, Henrich A, Rosentritt M, Handel G, Bürgers R. Influence of artificial ageing on surface properties and *Streptococcus mutans* adhesion to dental composite materials. J Mater Sci Mater Med 2010; 21:823-833.
- 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; 19:2619-2627.

- Hahnel S, Rosentritt M, Handel G, Bürgers R. Influence of saliva substitute films on initial *Streptococcus mutans* adhesion to enamel and dental substrata. *J Dent* 2008; 36:977-983.
- Hahnel S, Rosentritt M, Handel G, Bürgers R. In vitro evaluation of artificial ageing on surface properties and early *Candida albicans* adhesion to prosthetic resins. *J Mater Sci Mater Med* 2009; 20:249-255.
- Hallab N, Merritt K, Jacobs JJ. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83:428-436.
- Handley PS, Carter PL, Wyatt JE, Hesketh LM. Surface structures (peritrichous fibrils and tufts of fibrils) found on *Streptococcus sanguis* strains may be related to their ability to coaggregate with other oral genera. *Infect Immun* 1985; 47:217-227.
- Hannig C, Wasser M, Becker K, Hannig M, Huber K, Attin T. Influence of different restorative materials on lysozyme and amylase activity of the salivary pellicle in situ. *J Biomed Mater Res* 2006; 78A:755-761.
- Hannig M, Hannig C. The oral cavity- a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Invest* 2009; 13:123-139.
- Harris LG, Richards RG. Staphylococci and implant surfaces: a review. *Injury* 2006; 37:3-14.
- Harty DWS, Willcox MDP, Wyatt JE, Oyston PCF, Handley PS. The surface ultrastructure and adhesive properties of a fimbriate *Streptococcus sanguis* strain and six non-fimbriate mutants. *Biofouling* 1990; 2:75-86.
- Hellwig E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung. 4. Auflage Urban & Fischer Verlag, 2006.
- Heuer W, Elter C, Demling A, Neumann A, Suerbaum S, Hannig M, Heidenblut T, Bach FW, Stiesch-Scholz M. Analysis of early biofilm formation on oral implants in man. *J Oral Rehab* 2007; 34:377-382.
- Hildebrand HF, Veron C, Maxtin P. Nickel, chromium, cobalt dental alloys and allergic reactions: an overview. *Biomaterials* 1989; 10.

Hoffman AS. Letter to the Editor: A general classification scheme for “ hydrophilic” and “hydrophobic” biomaterial surfaces. J Biomed Mater Res 1986; 20.

Hosman AH, van der Mei HC, Bulstra SK, Busscher HJ, Neut D. Metal-on-metal bearings in total hip arthroplasties: Influence of cobalt and chromium ions on bacterial growth and biofilm formation. J Biomed Mater Res A 2009; 88:711-716.

Hu X, Neoh KG, Shi Z, Kang ET, Poh C, Wang W. An in vitro assessment of titanium functionalized with polysaccharides conjugated with vascular endothelial growth factor for enhanced osseointegration and inhibition of bacterial adhesion. Biomaterials 2010; 31:8854-8863.

Ilie N, Hickel R. Silorane-based Dental Composite: Behavior and Abilities. Dent Mater 2006; 25:445-454.

Imazato S, Ebi N, Takahashi Y, Kaneko T, Ebisu S, Russell RRB. Antibacterial activity of bactericide-immobilized filler for resin-based restoratives. Biomaterials 2003; 24:3605-3609.

Ivoclar Vivadent: Wissenschaftliche Arbeit über das Komposit Tetric Evo Ceram 2006.

Jenkinson HF, Carter DA. Cell surface mutants of *Streptococcus sanguis* with altered adherence properties. Oral Microbiol Immunol 1988; 3:53-57.

Jenkinson HF, Lamont RJ. Streptococcal adhesion and colonization. Crit Rev Oral Biol Med 1997; 8:175-200.

Käs C. Quantifizierung der Adhesion von *Streptococcus gordonii* DL1 an zahnärztlichen Werkstoffoberflächen. 2004, Dissertation, Universität Regensburg.

Kettenbach Dental. Produktinformation über Mucopren soft; 2006.

Khoo X, O'Toole GA, Nair SA, Snyder BD, Kenan DJ, Grinstaff MW. Staphylococcus aureus resistance on titanium coated with multivalent PEGylated-peptides. Biomaterials 2010; 31:9285-9292.

- Kielbassa AM. Speichel, orale Mikrobiologie und Bioadhäsion; in Hugger A, Türp JC, Kerschbaum T. Curriculum Orale Physiologie, Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin Chicago Tokio Barcelona Istanbul London Mailand Moskau Mumbai Paris Prag Sao Paulo Seoul und Warschau, 2006, 143-159.
- Kilian M. Streptococcus and Lactobacillus, in Boriello SP, Murray PR, Funke G, Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections, Bacteriology Volume 2, Hodder Arnold, Hodder Education, Hodder Headline Group, London, 10. Auflage, 2005, 833-867.
- Kreth J, Yongshu Z, Herzberg MC. Streptococcal Antagonism in Oral Biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 2008; 190:4632-4640.
- Ladon D, Doherty A, Newson R, Turner J, Bhamra M, Case CP. Changes in metal levels and chromosome aberrations in the peripheral blood of patients after metal-on-metal hip arthroplasty. J Arthroplasty 2004; 19:78-83.
- Leckband D, Israelachvili J. Intermolecular forces in biology. Q Rev Biophys 2001; 34:105-267.
- Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle - a review. Adv Dent Res 2000; 14:22-28.
- Leonhardt A, Olsson J, Dahlén G. Bacterial colonization on titanium, hydroxyapatite, and amalgam surfaces in vivo. J Dent Res 1995; 74:1607.
- Leyer A. Untersuchungen der bakteriellen Adhäsion an dentale Adhäsivsysteme. 2010, Dissertation, Universität Regensburg.
- Lima EMCX, Koo H, Vacca-Smith AM, Rosalen PL, Del Bel Cury AA. Adsorption of salivary and serum proteins, and bacterial adherence on titanium and zirconia ceramic surfaces. Clin Oral Implants Res 2008; 19:780-785.
- Listgarten MA, Mayo HE, Tremblay R. Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man. A light and electron microscopic study. J Periodontol 1975; 46:10-26.
- Listgarten MA. The structure of dental plaque. Periodontol 2000 1994; 5:52-65.

- Liu Y, Strauss J, Camesano TA. Adhesion forces between *Staphylococcus epidermidis* and surfaces bearing self-assembled monolayers in the presence of model proteins. *Biomaterials* 2008; 29:4374-4382.
- Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement-a materials science perspective. *Biomaterials* 1998; 19:1621-1639.
- Ludwig K, Biffar R, Fischer H, Hannig M, Hopp M, Janda R, Lenz E, Strietzel R, Welker D, Wöstmann B. *Lexikon der Zahnmedizinischen Werkstoffkunde*, Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin Barcelona Beijing Chicago Istanbul Kopenhagen London Mailand Moskau Neu-Dehli Paris Prag Sao Paulo Seoul Tokio und Warschau, 2005.
- Maddikeri RR, Tosatti S, Schuler M, Chessari S, Textor M, Richards RG, Harris LG. Reduced medical infection related bacterial strains adhesion on bioactive RGD modified titanium surfaces: A first step toward cell selective surfaces. *Biomed Mater Res* 2008; 84A:425-435.
- Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Indust Microb* 1995; 15:169-175.
- Marxkors R, Meiners H. *Taschenbuch der zahnärztlichen Werkstoffkunde*. 5. überarbeitete und ergänzte Auflage, 2005.
- Matl FD, Obermeier A, Repmann S, Friess W, Stemberger A, Kuehn KD. New anti-infective coatings of medical implants. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:1957-1963.
- McNab R, Forbes H, Handley PS, Loach DM, Tannock GW, Jenkinson HF. Cell wall-anchored CshA polypeptide (259 Kilodaltons) in *Streptococcus gordonii* forms surface fibrils that confer hydrophobic and adhesive properties. *J Bacteriol* 1999; 181:3087-3095.
- McNab R, Holmes AR, Clarke JM, Tannock GW, Jenkinson HF. Cell surface polypeptide CshA mediates binding of *Streptococcus gordonii* to other oral bacteria and to immobilized fibronectin. *Infect Immun* 1996; 64:4204-4210.
- McNab R, Holmes AR, Jenkinson HF. Cell-surface polypeptides as determinants of hydrophobicity in *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus sanguis*. *Colloids Surf* 1995; 5:135-142.

- McNab R, Jenkinson HF. Aggregation-deficient mutants of *Streptococcus gordonii* Channon altered in production of cell-surface polysaccharides and proteins. Microb Ecol Health Dis 1992; 5:277-289.
- McNab R, Jenkinson HF, Loach DM, Tannock GW. Cell-surface-associated polypeptides CshA and CshB of high molecular mass are colonization determinants in the oral bacterium *Streptococcus gordonii*. Mol Microbiol 1994; 14:743-753.
- Meier R, Hauser-Gerspach I, Lüthy H, Meyer EJ. Adhesion of oral streptococci to all-ceramics dental restorative materials in vitro. J Mater Sci Mater Med 2008; 19:3249-3253.
- 3M ESPE. Informationsbroschüre über Filtek Siloran, 2006.
- 3M ESPE: Der klinische Umgang mit Filtek Siloran/Klinische Fälle, 2007.
- Millsap KW, Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ. Adhesion and surface-aggregation of *Candida albicans* from saliva on acrylic surfaces with adhering bacteria as studied in a parallel plate flow chamber. Antonie Van Leeuwenhoek 1999; 75:351-359.
- Millsap KW, Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ. Adhesive interactions between voice prosthetic yeast and bacteria on silicone rubber in the absence and presence of saliva. Antonie Van Leeuwenhoek 2001; 79:337-343.
- Mombelli A, Décaillot F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. J Clin Periodontol 2011; 11:203-213.
- Montanaro L, Campoccia D, Rizzi S, Donati ME, Breschi L, Prati C, Arciola CR. Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. Biomaterials 2004; 25:4457-4463.
- Morge S, Adamczak E, Linden LA. Variation in human salivary pellicle formation on biomaterials during the day. Arch Oral Biol 1989; 34:669-674.
- Müller R, Eidt A, Hiller KA, Katzur V, Subat M, Schweikl H, Imazato S, Ruhl S, Schmalz G. Influences of protein films on antibacterial or bacteria-repellent surface coatings in a model system using silicon wafers. Biomaterials 2009; 30:4921-4929.

- 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; 73:2653-2660.
- Müller R, Hiller KA, Schmalz G, Ruhl S. Chemiluminescence-based detection and comparison of protein amounts adsorbed on differently modified silica surfaces. *Anal Biochem* 2006; 359:194-202.
- Müller R, Ruhl S, Hiller KA, Schmalz G, Schweikl H. Adhesion of eukaryotic cells and *Staphylococcus aureus* to silicon model surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2008; 84:817-827.
- Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, McKee MD. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res* 1998; 40:324-335.
- Namba N, Yoshida Y, Nagaoka N, Takashima S, Matsuura-Yoshimoto K, Maeda H, Van Meerbeek B, Suzuki K, Takashiba S. Antibacterial effect of bactericide Immobilized in resin matrix. *Dent Mater* 2009; 25:424-430.
- Neut D, van Horn JR, van Kooten TG, van der Mei HC, Busscher HJ. Detection of biomaterial-associated infections in orthopaedic joint implants. *Clin Orthop Relat Res* 2003; 413:261-268.
- Nicholson JW. Chemistry of glass-ionomer cements: a review. *Biomaterials* 1998; 19:485-494.
- Norde W. Adsorption of proteins at solid-liquid interfaces. *Cells Mater* 1995; 5:97-112.
- Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. *Scand J Dent Res* 1987; 95:369-380.
- O'Brien WJ. *Dental Materials and Their Selection*, Quintessence Publishing Co, Inc, Chicago Berlin Tokyo Copenhagen London Paris Milan Barcelona Istanbul Sao Paulo New Dehli Moscow Prague and Warsaw, 3. Auflage, 2002.
- Owens DK, Wendt RC. Estimation of the surface free energy of polymers. *J Appl Polym Sci* 1969; 13:1741-1747.

- Palin WM, Fleming GJ, Burke FJ, Marquis PM, Randall RC. The influence of short and medium-term water immersion on the hydrolytic stability of novel low-shrink dental composites. *Dent Mater* 2005; 21:852-863.
- Palin WM, Fleming GJ, Nathwani H, Burke FJ, Randall RC. In vitro cuspal deflection and microleakage of maxillary premolars restored with novel low-shrink dental composites. *Dent Mater* 2005; 21:324-325.
- 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.
- Pratt-Terpstra IH, Weerkamp AH, Busscher HJ. The effects of pellicle formation on streptococcal adhesion to human enamel and artificial substrata with various surface free-energies. *J Dent Res* 1989; 68:463.
- Periasamy S, Kolenbrander PE. Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early and late colonizers of enamel. *J Bacteriol* 2009; 191:6804-6811.
- Price CL, Williams DW, Waters MG, Coulthwaite L, Verran J, Taylor RL, Stickler D, Lewis MA. Reduced adherence of *Candida* to silane-treated silicone rubber. *Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 74:481-487.
- Quirynen M, Bollen CM. 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.
- Rabel W. Einige Aspekte der Benetzungstheorie und ihre Anwendung auf die Untersuchung und Veränderung der Oberflächeneigenschaften von Polymeren. *Farbe und Lacke* 1971; 77:997-1005.
- Rafiq I, Gambhir AK, Wroblewski BM, Kay PR. The microbiology of infected hip arthroplasty. *Int Orthop* 2006; 30:532-535.
- Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: Where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng* 2004; 6:41-75.
- Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Biomaterials science- an introduction to materials in medicine 2nd Edition, 2004.

- Reclaru L, Lüthy H, Eschler P-Y, Blatter A, Susz C. Corrosion behaviour of cobalt–chromium dental alloys doped with precious metals. *Biomaterials* 2005; 26: 4358-4365.
- Rinastiti M, Özcan M, Siswomihardjo W, Busscher HJ, van der Mei HC. Effect of biofilm on the repair bond strengths of composites. *J Dent Res* 2010; 89:1476-1481.
- Ritz HL. Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Arch Oral Biol* 1967; 12:1561-1568.
- Rodrigues L, van der Mei H, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R. Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 46:107-112.
- Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microb Infect* 2000; 2:1599-1607.
- 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 B Appl Biomater* 2008; 86B:36-44.
- Ruhl S. Proteine und Glykoproteine im Speichel: Interaktionen mit der oralen mikrobiellen Flora und mögliche klinische Bedeutung. 1999, Habilitationsschrift, Universität Regensburg.
- Ruhl S, Mueller R, Hiller K-A, Schmalz G. Chemiluminescence-based detection and comparison of protein amounts adsorbed on differently modified silica surfaces. *Anal Biochem* 2006; 359:194-202.
- Ruhl S, Sandberg AL, Cisar JO. Salivary receptors for the proline-rich protein-binding and lectin-like adhesins of oral actinomyces and streptococci. *J Dent Res* 2004; 83:505-510.
- Satou J, Fukunaga A, Satou N, Shintani H, Okuda K. Streptococcal adherence on various restorative materials. *J Dent Res* 1988; 67:588.
- Scannapieco FA. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med* 1994; 5:203-248.

- Schaffer AW, Pilger A, Engelhardt C, Zweymueller K, Ruediger HW. Increased blood cobalt and chromium after total hip replacement. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999; 37:839-844.
- Scheie AA. Mechanisms of dental plaque formation. *Adv Dent Res* 1994; 2:246-253.
- Schmalz G. Komposit-Kunststoffe; in Schmalz G, Arenholt-Bindslev. *Biokompatibilität zahnärztlicher Werkstoffe*, Elsevier GmbH, Urban und Fischer Verlag, München, 1. Auflage, 2005, 100-132.
- Schmalz G. Zemente und Keramiken; in Schmalz G, Arenholt-Bindslev. *Biokompatibilität zahnärztlicher Werkstoffe*, Elsevier GmbH, Urban und Fischer Verlag, München, 1. Auflage, 2005, 134-179.
- Senechal A, Carrigan SD, Tabrizian M. Probing surface adhesion forces of *Enterococcus faecalis* to medial-grade polymers using atomic force Microscopy. *Langmuir* 2004; 20:4172-4177.
- Smith DC. Development of glass-ionomer cement systems. *Biomaterials* 1998; 19:467-478.
- Steinberg D, Eyal S. Early formation of *Streptococcus sobrinus* biofilm on various dental restorative materials. *J Dent* 2002; 30:47-51.
- 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; 23:171-176.
- Sulzer Medica (heute: Zimmer GmbH). Produktinformation, Sulzer Orthopedics-Materials, 2001.
- Takahashi Y, Konishi K, Cisar JO, Yoshikawa M. Identification and characterization of *hsa*, the gene encoding the sialic acid-binding adhesin of *Streptococcus gordonii* DL1. *Infect Immun* 2002; 70:1209-1218.
- Tedjo C, Neoh KG, Kang ET, Fang N, Chan V. Bacteria–surface interaction in the presence of proteins and surface attached poly(ethylene glycol) methacrylate chains. *J Biomed Mater Res* 2007; 82A:479-491.

- ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology* 2006; 94:1-9.
- Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17:68-81.
- Uyen M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Arends J. Surface free energies of oral streptococci and their adhesion to solids. *FEMS Microbiol Letters* 1985; 30:103-106.
- van der Mei HC, White DJ, Kamminga-Rasker HJ, Knight J, Baig AA, Smit J, Busscher HJ. Influence of dietary components in saliva and dentifrices on the wettability of pellicle-coated enamel in vitro and in vivo. *Eur J Oral Sci* 2002; 110: 434-438.
- van Dijk J, Herkströter F, Busscher H, Weerkamp A, Jansen H, Arends J. Surface-free energy and bacterial adhesion. An in vivo study in beagle dogs. *J Clin Periodontol* 1987; 14:300-304.
- van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK (1986) Nature of the antigen–antibody interaction. Primary and secondary bonds: optimal conditions for association and dissociation. *J Chromatogr* 376:111-119.
- van Oss CJ. Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. *J Mol Recognit* 2003; 16:177-190.
- van Rensburg B.G. Jansen. *Mundbiologie*, Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin Chicago Tokio London Moskau Prag Sao Paulo und Warschau, 1994.
- Vaupel P. Funktionen des Magen-Darm-Trakts; in Schmidt RF, Thews G, Lang F (Hrsg.). *Physiologie des Menschen*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 30. Auflage, 2007, 860-905.
- Vogler EA. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv Colloid Interface Sci* 1998; 74:69-117.
- Walz A, Stühler K, Wattenberg A, Hawranke E, Meyer HE, Schmalz G, Blüggel M, Ruhl S. Proteome analysis of glandular parotid and submandibular-sublingual

saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2006; 6:1631-1639.

Weinmann W, Thalacker C, Guggenberger R. Siloranes in dental composites. *Dent Mater* 2005; 21:68-74.

Witzleb WC, Ziegler J, Krummenauer F, Neumeister V, Guenther KP. Exposure to chromium, cobalt and molybdenum from metal-on-metal total hip replacement and hip resurfacing arthroplasty. *Acta Orthop* 2006; 77:697-705.

Yasuyuki M, Kunihiro K, Kurissery S, Kanavillil N, Sato Y, Kikuchi Y. Antibacterial properties of nine pure metals: a laboratory study using *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biofouling* 2010; 26:851-858.

Young T. An essay on the cohesion of fluids. *Phil Trans Roy Soc Lond Math Phys Sci* 1805; 95:65-87.

Zijnga V, van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, Harmsen HJM. Oral biofilm architecture on natural teeth. *Plos One* 2010; 5:9321.

8. Danksagung

Ich möchte diese Danksagung nutzen, um allen Personen meinen Dank auszusprechen, die am Gelingen dieser Dissertation beteiligt waren und ohne die eine Fertigstellung nicht möglich gewesen wäre.

Für die freundliche Überlassung des Themas und die großzügige Bereitstellung der Arbeitsmittel zur Durchführung der Versuche möchte ich zuerst Herrn Professor Dr. G. Schmalz sehr herzlich danken.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. H. Schweikl für sein großes Engagement, für seinen außergewöhnlichen Einsatz und für die Betreuung während der Durchführung der Versuche sowie viele wertvolle Ratschläge bei der Erstellung und Korrektur der Dissertation.

Herrn Dr. rer. nat. K.A. Hiller danke ich für die Durchführung der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Ebenfalls gedankt sei auch Herrn Dr. Rainer Müller für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Frau Brigitte Bey und Frau Helga Ebensberger gilt mein Dank für die Herstellung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Besonderer Dank gebührt Herrn MTA Andreas Eidt für die sehr freundschaftliche Zusammenarbeit und umfassende Hilfe bei der Durchführung der praktischen Versuche und viele wertvolle Ratschläge.

Allen anderen Mitarbeitern des Labors der Zahnerhaltung und Parodontologie, die mich bei der Durchführung dieser Dissertation mit Rat und Tat unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Nicht zuletzt möchte ich jedoch ganz besonders meinen Eltern, meiner Schwester Julia, meinen Großeltern und meiner Freundin Judith danken, ohne deren Liebe und Unterstützung mein gesamtes Studium nicht möglich gewesen wäre.