

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
PROF. DR. WOLFGANG BUCHALLA
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Effektivität der antimikrobiellen photodynamischen
Therapie gegenüber einem Biofilm aus Karies-
assoziierten Bakterien *in vitro*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Fabian Wimmer

2020

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
PROF. DR. WOLFGANG BUCHALLA
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Effektivität der antimikrobiellen photodynamischen
Therapie gegenüber einem Biofilm aus Karies-
assoziierten Bakterien *in vitro*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Fabian Wimmer

2020

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Buchalla
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Tim Maisch

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 06. 2020

MEINEM VATER

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	1
Der Einfluss der photodynamischen Therapie auf einen neuartigen	
Kariesbiofilm	
Einleitung.....	2
Material und Methoden.....	5
Ergebnisse.....	10
Diskussion.....	13
Publikation	18
Danksagung	26
Lebenslauf	28
Literaturverzeichnis	30

Vorwort

Diese Dissertation basiert auf einer Originalpublikation, welche in der Fachzeitschrift *Caries Research* veröffentlicht wurde. Dem Abdruck der englischsprachigen Originalarbeit ist hier eine Zusammenfassung in deutscher Sprache vorangestellt.

Folgend der Titel der Publikation:

Phenalen-1-one mediated antimicrobial photodynamic therapy and chlorhexidine applied to a novel caries biofilm model

Fabian Cieplik, **Fabian Wimmer**, Denise Muehler, Thomas Thurnheer, Georgios N. Belibasakis, Karl-Anton Hiller, Tim Maisch und Wolfgang Buchalla (2018): Caries Res. 52:447-453.

Impact-Factor 2017: 2,188

Einleitung

Laut der Global Burden of Disease Studie 2015 ist Karies mit 2,3 Milliarden betroffenen Erwachsenen und 560 Millionen Kindern immer noch die häufigste Erkrankung weltweit [GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2016] und kann daher als eine große wirtschaftliche Belastung für das öffentliche Gesundheitswesen angesehen werden [Sheiham, 2001]. Bei der Verteilung von Zahnkaries ist bekannt, dass es Unterschiede abhängig von der sozialen Stellung, der Ernährung und dem Fluoridgebrauch gibt, was zu einer Subpopulation mit hoher Kariesinzidenz führt [Edelstein, 2006]. Daher bleibt die Entwicklung von Präventionskonzepten für diese Risikopatienten ein wichtiges Ziel. Bezuglich dieser Thematik können für betroffene Patientensubgruppen unterstützende antimikrobielle Maßnahmen in der täglichen Mundhygienepraxis zusätzlich zur mechanischen Entfernung von Biofilmen sinnvoll sein [ten Cate, 2009]. Das hierzu am häufigsten eingesetzte Antiseptikum ist Chlorhexidin (CHX), welches entweder als Mundspülung, als Gel oder Lack verwendet wird [Walsh et al., 2015]. Die tatsächlichen Auswirkungen von CHX auf die Kariesprävention werden jedoch kontrovers diskutiert und der Einsatz von CHX zeigt zudem einige unerwünschte Nebeneffekte wie gelb-braune Verfärbungen von Zähnen und Zunge und eine Veränderung des Geschmacksempfindens [Autio-Gold, 2008]. Darüber hinaus wurde in jüngster Zeit empfohlen, die Anwendung von CHX auf Gebiete mit deutlichem Patientennutzen (d.h. hauptsächlich in der Intensivpflege) zu beschränken, um das Risiko, erworbene Resistenzen gegen CHX oder gar Kreuzresistenzen gegen Antibiotika in Krankheitserregern hervorzurufen, möglichst gering zu halten [Kampf, 2016]. Dementsprechend berichteten Kitagawa et al., dass eine wiederholte Exposition von *Enterococcus faecalis* gegenüber CHX zu einer phenotypischen Adaption führte, die durch erhöhte minimale Hemm-Konzentrationen (minimum inhibitory

concentrations, MICs) nachgewiesen wurde [Kitagawa et al., 2016]. Vor diesem Hintergrund könnte die antimikrobielle photodynamische Therapie (aPDT) eine Alternative darstellen [Gursoy et al., 2013; Wainwright et al., 2017]. aPDT ist ein Drei-Komponenten-System, bestehend aus einem *per se* ungiftigen Farbstoff, dem Photosensibilisator (PS), Licht einer geeigneten Wellenlänge und molekularem Sauerstoff. Wenn das PS-Molekül ein Photon absorbiert, geht es in einen angeregten Zustand über. Es gibt mehrere Mechanismen um seinen Grundzustand wiederherzustellen, die in einem Jablonski-Diagramm [Ormond, A.B. et. Al., 2013] darstellbar sind (Abbildung 1). Grundsätzlich kann das angeregte Molekül durch Abgabe von Wärme oder Fluoreszenz wieder das ursprüngliche Energieniveau einnehmen. Über das sogenannte Intersystem-Crossing bestehen zwei Mechanismen reaktive Sauerstoffspezies zu erzeugen. Beim Typ I Mechanismus wird die Ladung auf ein Substrat oder molekularen Sauerstoff übertragen, wodurch Sauerstoffradikale wie Superoxidanionen und Hydroxylradikale oder nachfolgend Wasserstoffperoxid entstehen. Beim Typ-II-Mechanismus wird Energie direkt auf molekularen Sauerstoff übertragen,

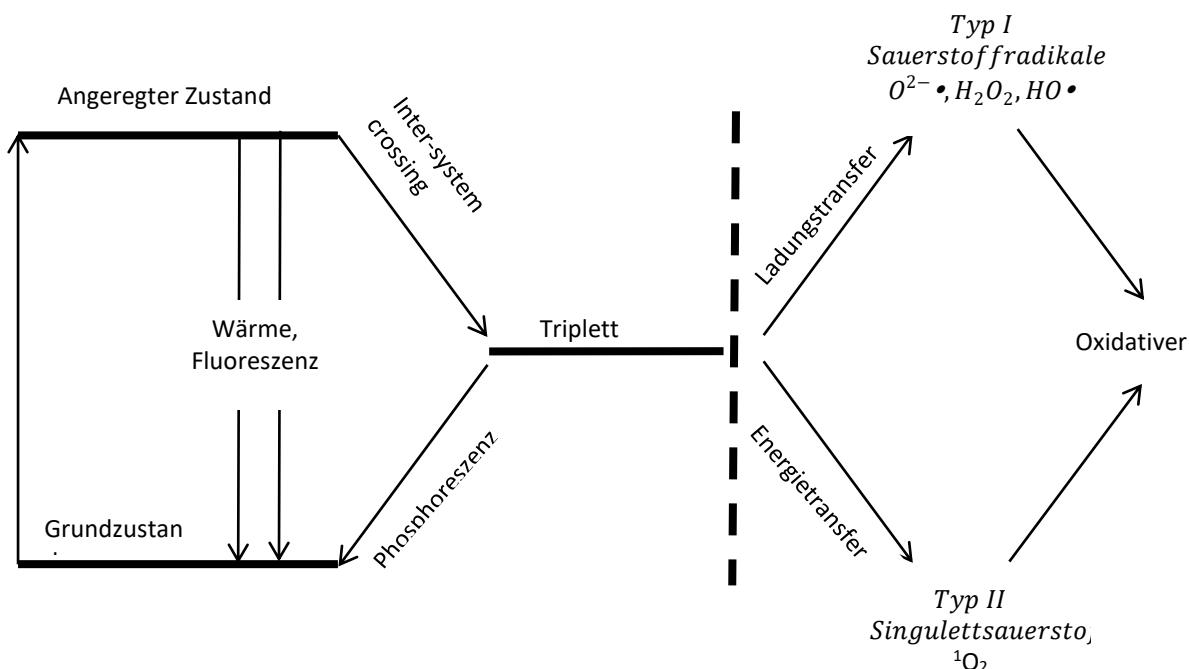


Abbildung 1: Das vereinfachte Jablonski-Diagramm zeigt schematisch die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies analog der Photodynamischen Therapie. Nachdem der Photosensibilisator durch Belichtung geeigneter Wellenlänge in einen angeregten Zustand übergeht, bestehen durch Inter-system crossing 2 verschiedene Wege reaktive Sauerstoffspezies zu erzeugen. Der Grundzustand kann allerdings auch unter interner Umwandlung (Wärme) und Fluoreszenz erreicht werden, ohne, dass reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden.

wodurch Singulett-Sauerstoff (${}^1\text{O}_2$) entsteht, der als die effektivste reaktive Sauerstoffspezies gilt [Wainwright, 1998; Schweitzer und Schmidt, 2003; Cieplik et al., 2014]. Dabei beschreibt die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_Δ den jeweiligen Anteil des Typ-II-Mechanismus [Maisch et al., 2007]. Aufgrund des unselektiven Wirkmechanismus ist eine Erhöhung der Toleranz bis hin zur Induktion von Resistenz gegenüber aPDT sehr unwahrscheinlich [Tavares et al., 2010; Giuliani et al., 2010], insbesondere für den Typ II-Mechanismus [Cieplik et al., 2013]. Dementsprechend scheinen PS auf Basis einer Phenalen-1-on-Struktur aufgrund ihrer hohen Singulett-Sauerstoffquantenausbeute ($\Phi_\Delta \geq 0,95$) besonders vorteilhaft zu sein [Späth et al., 2014; Cieplik et al., 2013; Tabenski et al. 2016]. Darüber hinaus bringt die Zahn-ähnliche Farbe von Phenalen-1-on-Derivaten bei der oralen Anwendung keine ästhetischen Nachteile mit sich [Späth et al., 2014]. Vor jeder klinischen Anwendung ist es jedoch ratsam, neuartige antimikrobielle Ansätze auf ihre Wirksamkeit gegenüber Biofilmen hin zu evaluieren, da bekanntermaßen in Biofilme eingebettete Bakterien im Vergleich zu ihren planktonischen Pendants eine stark erhöhte Toleranz gegenüber antimikrobiellen Verfahren aufweisen [Marsh, 2004]. Dementsprechend ist es zielführend, zukünftig neue *in-vitro*-Biofilmmodelle zu entwickeln, die einfache Kulturbedingungen gewährleisten und eine hohe Screening-Rate von antimikrobiellen Verbindungen oder Ansätzen ermöglichen.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die antimikrobielle Wirksamkeit von Phenalen-1-on-vermittelter aPDT an einem neuartigen polymikrobiellen Biofilm-Modell, bestehend aus kariesassoziierten Bakterien, im Vergleich zum Goldstandard-Antiseptikum CHX zu bewerten.

Material und Methoden

Chemikalien und Lichtquellen:

Der in dieser Studie verwendete PS war SAPYR (2-((4-Pyridinyl)methyl)-1H-phenalen-1-onechloride und wurde am Institut für Organische Chemie (Universität Regensburg, Deutschland) synthetisiert (Reinheit $\geq 95\%$) [Cieplik et al., 2013; Späth et al., 2014]. PS-Suspensionen wurden frisch für die Experimente vorbereitet und nicht länger als 2 Wochen im Dunkeln bei 4°C gelagert. Für die Bestrahlung des PS wurde eine Gasentladungslampe (Waldmann PIB 3000; Waldmann Medizintechnik, Villingen-Schwenningen, Deutschland) eingesetzt, welche ein Emissionsspektrum von $\lambda_{em} = 380\text{-}600 \text{ nm}$ besitzt. Die Bestrahlungsstärke wurde auf 50 mW/cm^2 auf Probenebene eingestellt, was zu einer Energiedosis von 30 J/cm^2 bei einer Bestrahlungsdauer von 10 min führte. CHX-Digluconat, gelöst in destilliertem Wasser, wurde von der Apotheke des Universitätsklinikums Regensburg in Konzentrationen von 0,2 und 2 Vol.-% bereitgestellt.

Bakterienkultur und Biofilmkultivierung

Drei Referenzstämme, *Actinomyces naeslundii* (DSM- 43013), *Actinomyces odontolyticus* (DSM-19120) und *Streptococcus mutans* (DSM-20523), die in dieser Studie Verwendung fanden, wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland) bezogen. Mittels Dreiösenausstrichen wurden auf Columbia- (*Actinomyces spp.*) und Schaedler- (*S. mutans*) Agarplatten (bereitgestellt vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg, Regensburg, Deutschland) Bakterien in einem Mikroinkubator (MI23NK, SCHOLZEN Microbiology

Lösung	Chemikalien	Menge
RTF I	KH ₂ PO ₄ Dest. Wasser	6,0g 1000ml
RTF II	NaCl (NH ₄) ₂ SO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ Dest. Wasser	12,0g 12,0g 6,0g 2,5g 1000ml
Stammlösung I	K ₂ HPO ₄ Dest. Wasser	9,078g 1000ml
Stammlösung II	Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O Dest. Wasser	11,876g 1000ml
Sörensen Puffer	Stammlösung I Stammlösung II	330ml 670ml
Stammlösung Hemin	KOH 0,1N Ethanol Dest. Wasser Hemin-HCL	100ml 50ml 50ml 200mg
Stammlösung Menadione	Menadione Ethanol	25mg 50ml
Lösung A	Tryptone Yeast Extract NaCl KNO ₃ Hemin Stammlösung Sörensen Puffer	10,0g 5,0g 2,0g 1,0g 1,0ml 800ml
Lösung B	Glucose Saccarose Cystein –HCl Na ₂ CO ₃ Sörensen Puffer	300mg 300mg 100mg 100mg 10ml
mFUM	RTF I RTF II Lösung A Lösung B Menadione Stammlösung	15ml 15ml 160ml 10ml 400µl
BCM	mFUM Speichel FBS	50ml 40ml 10ml

Tabelle 1: Ausgangsstoffe und Grundlösungen zur Herstellung von mFUM. Zunächst wurden RTF I und RTF II sowie Stammlösung 1 und 2 hergestellt. Sörensen-Puffer wurde wie angegeben aus Stammlösung 1 und Stammlösung 2 hergestellt. Nach der Erstellung einer Hemin-Stammlösung konnten anschließend Lösung A und Lösung B hergestellt werden. mFUM wurde schließlich aus RTF I, RTF II, Lösung A und Lösung B unter Zugabe von Menadione hergestellt. Das Biofilmkulturmedium BCM bestand aus mFUM, steril filtriertem humanen Speichel sowie FBS.

Systems, Necker, Schweiz) unter anaeroben Bedingungen (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) kultiviert. Als basales flüssiges Medium wurde das sogenannte „Modifizierte flüssige Universalmedium (mFUM)“ (Tabelle 1) eingesetzt [Gmür und Guggenheim, 1983; Guggenheim et al., 2001]. Dieses wurde zuvor aus mehreren Grundlösungen hergestellt und wird durch Zusatz von 67 mmol/L Sörensen-Puffer (pH = 7,2) und Kohlenhydratanteilen (0,15% Glukose und 0,15% Saccharose) ergänzt. Um die Reinheit der Lösungen zu gewährleisten, wurden sie alle 2 Wochen bzw. vor jedem neuen antimikrobiellen Test neu angesetzt. Dabei wurden die Grundlösungen im Autoklaven (Varioklav 75T, HP Medizintechnik GmbH, Bruckmannring 19, 85764 Oberschleißheim) bei 120°C für 20 Minuten sterilisiert. Beginnend mit *A. odontolyticus* und *A. naeslundii*, wurden zur Vorbereitung von planktonischen Kulturen, Kolonien von den jeweiligen Nährböden abgenommen und in 5 mL mFUM mit 0,5 mL fetalem Rinderserum (FBS; Gibco® Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) für 24 Stunden unter anaeroben Bedingungen inkubiert, um Bakterien in der stationären Wachstumsphase zu erhalten. Anschließend wurden die Suspensionen zentrifugiert (ROTINA 420 R, Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland) und das Pellet in mFUM resuspendiert. Durch Verdünnen mit mFUM wurde eine optische Dichte von 1,0, welche mit einem Spektrometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen wurde, eingestellt (Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences, Amersham, UK). Die Bakteriensuspensionen wurden im Verhältnis 1:9 in dem Biofilm-Kulturmedium (BCM) verdünnt, das aus 50% mFUM, 40% humanem Speichel und 10% FBS bestand. Der Speichel wurde von 2 Freiwilligen der Arbeitsgruppe gespendet (Votum der Ethikkommission an der Universität Regensburg, Aktenzeichen: 17-782 1-101) und mit absteigender Filtergröße steril gefiltert (Porengröße: 5; 1,2; 0,45 und 0,2 µm; Acrodisc® Syringe Filters, Pall Corporation, Newquay, UK). Die Polyspeziesbiofilme wurden in 96-Well-Polystyrol-Kulturplatten (Corning® Costar®, Corning, NY, USA) als sogenannte statische Biofilme kultiviert. Zur Simulation der Pellikel-Beschichtung wurden die Wells zunächst für 2 Stunden bei

Raumtemperatur mit sterilem Speichel inkubiert. Danach wurde der Speichel verworfen und die einzelnen Wells mit insgesamt 200 µL Bakteriensuspension mit *A. naeslundii* und *A. odontolyticus* gefüllt und unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium vorsichtig mit einer Pipette entfernt, sodass die intakte Biofilmschicht basal nicht beeinträchtigt wurde. Anschließend wurde 200 µL frisches BCM, welches nun *S. mutans* und die für dieses Bakterium wichtige Saccarose beinhaltete, hinzugefügt. Dieses wurde zuvor analog der Actinomyces-Medien behandelt, jedoch auf eine optische Dichte von 0,1 eingestellt, um ein Überwachsen durch *S. mutans* zu verhindern. Nach 48 h wurde ein weiterer Mediumwechsel ohne Zugabe von Bakterien durchgeführt, danach wurden die Biofilme für weitere 24 Stunden inkubiert.

Die Bildung von Monospeziesbiofilmen wurde analog durchgeführt: Nach einer 2-stündigen Inkubation mit Speichel wurden die Wells mit 200 µL BCM gefüllt, welches nun jeweils *A. naeslundii*, *A. odontolyticus* oder *S. mutans* separat enthielt. Der einzige Unterschied bestand darin, dass nach 24 Stunden *S. mutans* nicht zugegeben wurde, sondern einzeln kultiviert wurde. Medienwechsel erfolgten nach 24 und 48 Stunden. In allen Fällen betrug die gesamte Kulturdauer 72 Stunden.

Antimikrobieller Test

Nach 72 h wurde das Medium sorgfältig aus den Wells entfernt und die Biofilme mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS; Biochrom, Berlin, Deutschland; Gruppe PS- L+) oder Sapyr (100 µmol, Gruppe PS+ L+) im Dunkeln für 10 min inkubiert und dann für weitere 10 min beleuchtet (Tabelle 2). Die Kontrollgruppen ohne Belichtung, PS- L- bzw. PS+ L- und die Gruppen mit CHX 0,2 Vol-% oder CHX 2 Vol-% wurden für insgesamt jeweils 20 min im Dunkeln inkubiert (jeweils 50 µL). Unmittelbar danach wurden PBS, PS oder CHX vorsichtig entfernt, und jeder Biofilm wurde mit 200 µL PBS in Suspension gebracht und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Diese wurden in eine Ultraschallwasserbadkammer

(Sonorex Super RK 102 H, Bandelin, Berlin, Deutschland) mit einer Frequenz von 35 kHz für 10 min beschallt und dann für 5s gevortext (REAX top, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland), um aggregierte Bakterien zu separieren. Zehnfache serielle Verdünnungen (10^{-2} bis 10^{-7}) wurden in PBS hergestellt, und aliquote Teilsuspensionen (180 µL) wurden auf Columbia-Blutagar mit sterilen Drigalskispateln plattiert und 72 h anaerob inkubiert. Anschließend wurden koloniebildende Einheiten (Colony forming units; CFU) ausgewertet. Für Polyspeziesbiofilme wurden Bakterien auf Agarplatten nach ihrer jeweiligen Koloniemorphologie unterschieden.

Gruppen	Erläuterung
PS- L+	Kein Photosensitizer, mit Beleuchtung
PS- L-	Kein Photosensitizer, ohne Beleuchtung
PS+ L+	Photosensitizer (SAPYR), mit Beleuchtung
PS+ L-	Photosensitizer (SAPYR), ohne Beleuchtung
CHX 0,2%	Chlorhexidindigluconat 0,2%
CHX 2%	Chlorhexidindigluconat 2%
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

Tabelle 2: Erläuterung der in dieser Arbeit verwendeten Gruppen mit welchen die Biofilme behandelt wurden.

Datenanalyse

Alle Ergebnisse wurden als Mediane und benachbarte Quartile (25/75% Perzentile) dargestellt und wurden mit SPSS für Windows, Version 23 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), aus den Werten von mindestens 6 unabhängigen Experimenten berechnet, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden. In den grafischen Darstellungen stellen horizontal gepunktete bzw. gestrichelte Linien CFU-Reduktionen von 3 bzw. 5 \log_{10} Stufen im

Vergleich zur entsprechenden unbehandelten Kontrollgruppe PS- L- dar. Mediane auf oder unter diesen Linien zeigen Reduktionsraten von mindestens 99,9% ($3 \log_{10}$) bzw. 99,999% ($5 \log_{10}$), die gemäß den Richtlinien der Infektionskontrolle [Boyce und Pittet, 2002] als biologisch relevante antimikrobielle Aktivität oder Desinfektionswirkung deklariert werden.

Ergebnisse

Antimikrobielle Effektivität gegen Polyspezies Biofilme

Unbehandelte Polyspezies-Biofilme (PS- L-) zeigten ein Überwachsen, also übermäßiges Vorhandensein von *S. mutans* ($4,7 \times 10^7$) von $\approx 1 \log_{10}$ Stufe mehr im Vergleich zu *A. naeslundii* ($3,8 \times 10^6$) und *A. odontolyticus* ($4,3 \times 10^6$). Das linke Feld von Abbildung 2 zeigt die absoluten CFU-Werte von unbehandelten Proben, während das rechte Feld relative CFU-Daten zu den unbehandelten Proben (Gruppen PS- L-) darstellt, welche auf 100% normiert sind. aPDT reduzierte die CFU von *S. mutans* ($2,8 \log_{10}$) mehr als die CFU von *A. naeslundii* und *A. odontolyticus* ($1,2$ bzw. $1,3 \log_{10}$), während die Behandlung mit PS ohne Licht (PS+ L-) oder Licht allein (PS- L+) keine antimikrobielle Wirkung hatte. CHX 0,2 Vol-% reduzierte die CFU aller Spezies durch $\approx 4 \log_{10}$ -Schritte (*S. mutans*: $4,0 \log_{10}$; *A. naeslundii*: $4,5 \log_{10}$; *A. odontolyticus*: $3,8 \log_{10}$), während CHX 2 Vol-% zur Eradikation um $> 6 \log_{10}$ unterhalb der Nachweisgrenze führte.

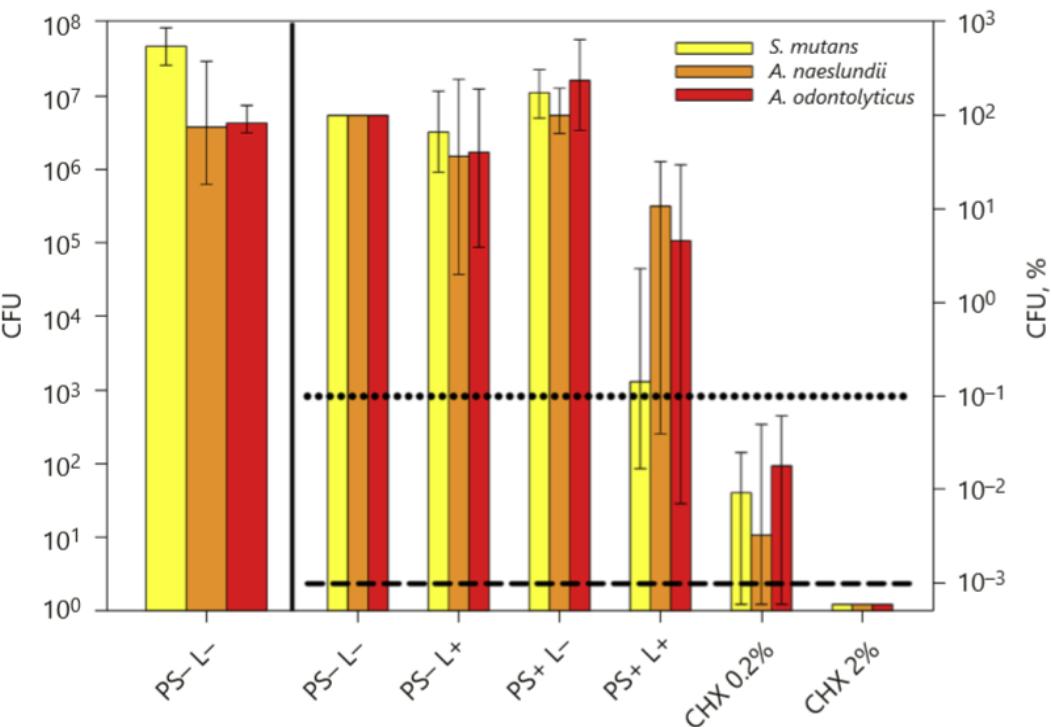


Abbildung 2: Antimikrobielle Effektivität bei Polyspezies-Biofilmen aus *A. naeslundii*, *A. odontolyticus* und *S. mutans*. Alle Ergebnisse sind als Mediane und benachbarte Quartile (25/75% Perzentile) auf einer \log_{10} skalierten Ordinate dargestellt. Das linke Feld zeigt absolute CFU-Daten von unbehandelten Kontrollgruppen (PS- L-), die ein Überwachsen von *S. mutans* von $1 \approx \log_{10}$ im Vergleich zu beiden *Actinomyces spp* zeigt. Das rechte Feld zeigt relative CFU-Daten mit unbehandelten Kontrollen (Gruppen PS- L-), die auf 100% normiert sind. Horizontale gepunktete und gestrichelte Linien stellen CFU-Reduktionen von $3 \log_{10}$ bzw. $5 \log_{10}$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen (PS- L-) dar. Licht (PS+ L+) oder PS allein (PS+ L-) zeigten keine Wirkung. aPDT (PS+ L+) führte zu einer höheren CFU-Reduktion von *S. mutans* ($2,8 \log_{10}$) als von *A. naeslundii* ($1,2 \log_{10}$) und *A. odontolyticus* ($1,3 \log_{10}$). CHX 0,2% reduzierte die CFU von *S. mutans* um $4,0 \log_{10}$, die CFU von *A. naeslundii* um $4,5 \log_{10}$ und die CFU von *A. odontolyticus* um $3,8 \log_{10}$. CHX 2% führte zu einer Reduzierung der CFU um $> 6 \log_{10}$ unter die Nachweisgrenze. CFU - koloniebildende Einheiten; PS - Photosensibilisator; L - Licht; aPDT - antimikrobielle photodynamische Therapie; CHX - Chlorhexidin

Antimikrobielle Effektivität gegen Monospezies Biofilme

Unbehandelte Monospezies-Biofilme (Gruppen PS- L-) zeigten ein Wachstum von 2×10^8 , 4×10^7 und 1×10^6 CFU für *S. mutans*, *A. naeslundii* bzw. *A. odontolyticus*. Abbildung 3 zeigt relative CFU-Daten mit unbehandelten Kontrollen (Gruppen PS- L-), die auf 100% normiert sind.

Die CFU-Reduktion für aPDT (PS+ L+) betrug $3,0 \log_{10}$ für *S. mutans*, während *A. naeslundii* und *A. odontolyticus* nur um $2,5 \log_{10}$ bzw. $1,1 \log_{10}$ reduziert wurden. Im Gegensatz dazu

führte CHX 0,2% zu Reduktionsraten von $4,3 \log_{10}$ für *S. mutans* und *A. odontolyticus*, während CFU von *A. naeslundii* um $6,0 \log_{10}$ reduziert wurden. Die Behandlung mit PS (PS+L-) oder nur mit Licht (PS- L+) hatte in keinem Fall eine biologisch relevante antimikrobielle Aktivität oder Desinfektionswirkung.

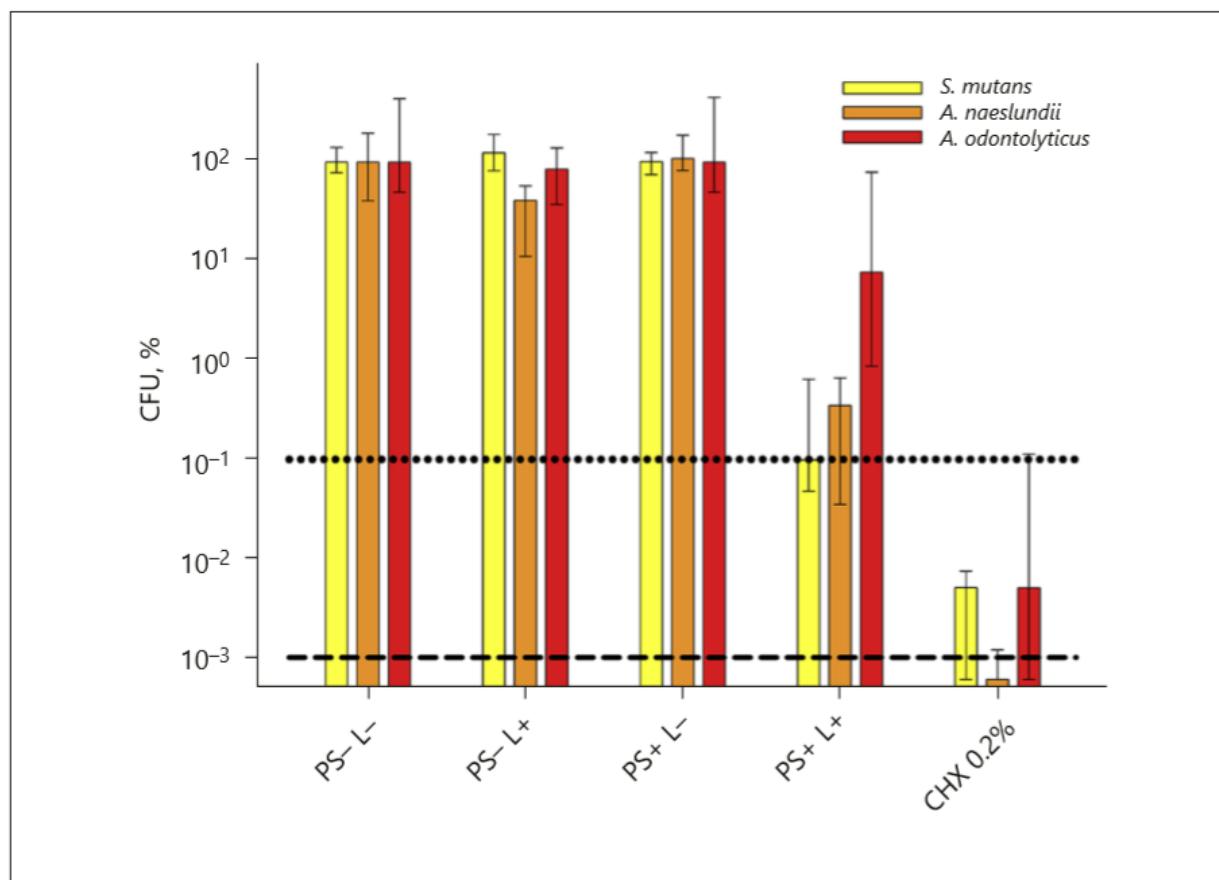


Abbildung 3: Antimikrobielle Wirksamkeit bei Monospezies-Biofilmen. Alle Ergebnisse werden als Mediane und benachbarte Quartile (25/75% Perzentile) dargestellt, die auf einer \log_{10} skalierten Ordinate als relative CFU-Daten mit den jeweiligen unbehandelten Kontrollen (Gruppen PS- L-) auf 100% normiert sind. Horizontale gepunktete und gestrichelte Linien stellen CFU-Reduktionen von $3 \log_{10}$ bzw. $5 \log_{10}$ im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen (PS- L-) dar. Es gab keinen Einfluss von Licht (PS- L+) oder PS allein (PS+ L-). aPDT (PS+ L+) führte zu einer CFU-Reduktion von $3,0 \log_{10}$ für *S. mutans*- Biofilme, während CFU in *A. naeslundii* und *A. odontolyticus*-Biofilme um $2,5 \log_{10}$ bzw. $1,1 \log_{10}$ reduziert wurden. CHX 0,2 Vol-% reduzierte CFU in *S. mutans* und *A. odontolyticus*-Biofilmen um $4,3 \log_{10}$ und in *A. naeslundii*-Biofilmen um $6,0 \log_{10}$. CFU - koloniebildende Einheiten; PS - Photosensibilisator; L -Licht; aPDT - antimikrobielle photodynamische Therapie; CHX - Chlorhexidin.

Diskussion:

Ziel der vorliegenden Studie war es, die antimikrobielle Wirksamkeit von Phenalen-1-on-vermittelter aPDT im Vergleich zum Goldstandard-Antiseptikum CHX zur Inaktivierung von Biofilmen aus Karies-assoziierten Bakterien *in vitro* zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde ein Biofilmmodell mit hoher Screening-Rate antimikrobieller Verbindungen etabliert, das *A. naeslundii*, *A. odontolyticus* und *S. mutans* umfasst. *A. naeslundii* gilt als essentieller Frühbesiedler im oralen Biofilm [Dige et al., 2009], während *A. odontolyticus* als Schlüsselorganismus für Adhäsion und Co-Aggregation im supragingivalen Biofilm gilt [Tang et al., 2003] und mit hoher Kariesinzidenz bei Kindern assoziiert wird [El Salhy et al., 2016]. *S. mutans* spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Zahnkaries, vor allem wegen seiner Fähigkeit, unlösliche extrazelluläre Polysaccharide zu bilden und wegen seiner ausgeprägten azidogenen und azidurischen Eigenschaften [Klein et al., 2015].

Die Kulturbedingungen für dieses Biofilmmodell wurden gegenüber dem ursprünglich von Guggenheim et al. [2001] beschriebenen Zürcher Biofilmmodell für supragingivale Plaque modifiziert: Statt der Pasteurisierung des humanen Speichels wurde die Filtersterilisation eingesetzt, da letztere im Hinblick auf die Proteinintegrität als schonender angesehen wird [Ruhl et al., 2011]. Außerdem wurden die Kohlenhydratkonzentrationen im hier in dieser Arbeit modifizierten Medium mFUM von 0,15% Glucose auf jeweils 0,15% Saccharose und Glucose geändert, da *S. mutans* Saccharose für die Glucosyltransferase-vermittelte Synthese von Exopolysacchariden benötigt [Kreth et al., 2008; Koo et al., 2010], während *Actinomyces* spp. bevorzugt Glucose für ihren Stoffwechsel über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg [Takahashi und Yamada, 1999] verwenden. Die Anteile von mFUM, Speichel und FBS im BCM wurden zur Erhöhung der Biofilmdichte und -festigkeit auf 50, 40 bzw. 10% eingestellt [Ammann et al., 2012]. Im Gegensatz zum Zürcher Biofilmmodell wurden Biofilme nicht auf Hydroxylapatit-Scheiben, sondern in 96-Well-Platten auf Polystyrol

kultiviert, um optimale experimentelle Bedingungen für die Untersuchung von lichtbasierten Ansätzen wie aPDT zu gewährleisten. Andernfalls hätte das Wachstum von Biofilmen, auf beiden Seiten der Hydroxylapatit-Scheiben, keine standardisierte Belichtungsbedingungen ermöglicht. Die Biofilmkultur wurde mit *A. naeslundii* und *A. odontolyticus* begonnen, während *S. mutans* nach 24 h Kultur hinzugefügt wurde [Dissertation F. Angermeier, 2018]. Dieses Vorgehen ermöglichte ein zahlenmäßiges Gleichgewicht der Spezies aufgrund der langsameren Zellteilung von *Actinomyces spp.* gegenüber Streptokokken [Dige et al., 2009]. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass bei Abwesenheit von *Streptococcus oralis*, *S. mutans* den Zürcher Biofilm auf Kosten von *Actinomyces oris* [Thurnheer und Belibasakis, 2018] dominiert. Außerdem kolonisiert *S. mutans* *in vitro* viel weniger effizient auf Streptokokken-Biofilmen als auf *A. naeslundii*-Biofilmen [Wang et al., 2011]. Im Vergleich zum Zürcher Biofilmmodell für supragingivale Plaque und seinen verschiedenen Modifikationen mit bis zu 11 Bakterien- oder Pilzarten [Guggenheim et al., 2001; Shapiro et al., 2002; Ammann et al., 2012; Belibasakis und Thurnheer, 2014] ist dieses Biofilmmodell hier in dieser Arbeit zwar weniger zahlreich in Bezug auf die mikrobielle Diversität, erlaubt andererseits aber ein robustes und hochdurchsatzfähiges Screening antimikrobieller Substanzen. Die Behandlung mit CHX 2,0 Vol.-% für 20 Minuten diente als Positivkontrolle und führte zur vollständigen Eradikation der Biofilmbakterien bis unterhalb der Nachweisgrenze. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit CHX 0,2 Vol.-% zu einer Reduktion von $\approx 4 \log_{10}$ Stufen, während kürzere Behandlungszeiten wesentlich geringere Inaktivierungsraten aufwiesen. Dies entspricht der Literatur, in der Wilson [1996] keine antimikrobielle Wirkung von CHX 0,2 Vol.-% nach Behandlung von 72-h *S. mutans* Biofilmen für 5 min, aber Eradikation von $>6 \log_{10}$ Stufen unterhalb der Nachweisgrenze nach Behandlung für 60 min berichtete. Ebenso fanden Voos et al. [2014] eine Inaktivierung von $\approx 1 \log_{10}$ Stufe nach Behandlung von *in situ* gebildeten Biofilmen mit CHX 0,2 Vol.-% für 3 min, während Hoogenkamp et al. [2009] eine Inaktivierung von $\approx 2 \log_{10}$ Stufen von *S.*

mutans Biofilmen nach Behandlung für 5 min zeigte. Generell besteht ein Zusammenhang zwischen Behandlungsdauer und antimikrobieller Wirksamkeit, insbesondere bei Biofilmen [Mah und O'Toole, 2001; Stewart und Costerton, 2001]. Die Diffusion bestimmter antimikrobieller Substanzen in tiefere Schichten des Biofilms kann durch die Wechselwirkung dieser positiv geladenen Moleküle mit den negativ geladenen Bestandteilen der extrazellulären polymeren Substanz des Biofilms behindert oder verlangsamt werden [Thurnheer et al., 2003; Tseng et al., 2013]. Kürzere Behandlungszeiten können daher nur zur Abtötung von Bakterien in den oberflächlichen Schichten des Biofilms führen, wie beispielsweise eine klassische Studie von Zaura-Arite et al. [2001] mittels konfokaler Mikroskopie nach LIVE/DEAD Färbung gezeigt hat. Die Behandlung mit aPDT in dieser Arbeit führte zu weniger ausgeprägten Inaktivierungsraten im Vergleich zu CHX. *S. mutans* wurde um $2,8 \log_{10}$ Stufen inaktiviert, während *A. naeslundii* und *A. odontolyticus* nur CFU-Reduktionen von 1,2 oder $1,3 \log_{10}$ Stufen aufwiesen. Hierbei muss allerdings bedacht werden, dass trotz einer identischen Gesamtbehandlungsdauer von 20 min (10 min Inkubation im Dunkeln gefolgt von 10 min Bestrahlung) die antimikrobielle Aktivität von aPDT auf die Belichtungsdauer begrenzt ist und die Wirkung von CHX aufgrund der hohen Substantivität möglicherweise über die Behandlungsdauer hinaus besteht. Interessanterweise zeigte *S. mutans*, obwohl aPDT als unselektiver antimikrobieller Ansatz bekannt ist [Wainwright et al., 2017], im Vergleich zu *A. naeslundii* und *A. odontolyticus* eine deutlich höhere Empfindlichkeit gegenüber der Phenalen-1-on-vermittelten aPDT. Der Einfluss der nachträglichen „Zugabe“ von *S. mutans* zu den Biofilmen, die möglicherweise nur zu einer oberflächlichen Besiedlung dieser Art innerhalb des Biofilms führen hätten können, kann hierbei ausgeschlossen werden, da in diesem Fall *S. mutans* auch in den CHX-Gruppen stärker inaktiviert worden wäre als beide *Actinomyces* spp. Die Anfälligkeit von *S. mutans* für aPDT wurde durch die Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit in Monospezies-Biofilmen aller drei Spezies weiter bestätigt. Hier zeigte die aPDT ebenso eine

höhere Inaktivierungswirksamkeit in *S. mutans* Biofilmen ($3,0 \log_{10}$) im Vergleich zu *A. naeslundii* ($2,5 \log_{10}$) und *A. odontolyticus* ($1,1 \log_{10}$) Biofilmen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz

zu einer früheren Studie, in der aPDT mit dem gleichen PS wie in der vorliegenden Studie zu einer Inaktivierung von $6,5 \log_{10}$ Stufen gegen *A. naeslundii* Monospezies-Biofilmen führte [Cieplik et al., 2015]. Dieser Unterschied in der antimikrobiellen Wirksamkeit kann jedoch auf die Verwendung eines anderen Stammes (*A. naeslundii* T14V) als in der vorliegenden Studie und auf die längere Inkubationszeit (25 min) zurückzuführen sein [Cieplik et al., 2015]. *Actinomyces* spp. sind allgemein bekannt für ihre dicken und robusten Zellwände, die sich gegenüber Speichel-Lysozym und anderen Peptidoglykan-hydrolysierenden Enzymen als widerstandsfähig zeigen [Delisle et al., 2006]. Daher kann die höhere Toleranz gegenüber aPDT auf eine unzureichende Durchlässigkeit für PS-Moleküle durch die Zellmembran zurückzuführen sein, wie von Dige et al. [2009], als Ursache für die unregelmäßige Verteilung von Fluoreszenzsignalen bei der Anwendung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung bei *A. naeslundii* diskutiert wurde. Außerdem neigen *Actinomyces* spp. dazu miteinander zu aggregieren [Dige et al., 2009] und sie können sogar durch Streptokokken eingekapselt werden, wie von Bos et al. [1996] diskutiert. Aufgrund der relativen Neuheit dieses Forschungsgebietes, gibt es in der Literatur zur Zeit keine weiteren Studien hinsichtlich der Effektivität der aPDT auf polymikrobielle Biofilme, die *in vitro* aus Karies-assoziierten Spezies wie *S. mutans* und *Actinomyces* spp. kultiviert wurden, weshalb die hier gefundene höhere Toleranz von *Actinomyces* spp. gegenüber Phenalen-1-on-vermittelter aPDT in zukünftigen Studien genauer untersucht werden sollte, z.B. mit Hilfe der Durchflusszytometrie zur Untersuchung von bakteriellen Membranveränderungen. Dieses Phänomen, der unterschiedlichen Toleranz verschiedener Bakterienspezies, könnte klinisch durch wiederholte Anwendung von aPDT genutzt werden, um eine Verschiebung von einer hochkariogenen Streptokokken-dominierten zu einer weniger kariogenen *Actinomyces*-dominierten Mikrobiota bei kariesaktiven Patienten zu induzieren. Im Licht der ökologischen

Plaque-Hypothese könnte dies einen interessanten Ansatz zur Biofilmmodulation darstellen [Marsh et al., 2015]. Vor einer klinischen Anwendung von Phenalen1-on-vermittelter aPDT müssen jedoch mögliche schädliche Auswirkungen auf das humane Gewebe ausgeschlossen werden. In einem ersten Schritt wurde in einer aktuellen Studie der Arbeitsgruppe aPDT mit mehreren Phenalen-1-on-Derivaten auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit in planktonischen Kulturen von dermalen Pathogenen und auf ihre eukaryontische Toxizität gegenüber Keratinozyten im Vergleich zum Biozid Benzalkoniumchlorid untersucht, um einen potenziellen effektiven Konzentrationsbereich (d.h. $5 \geq \log_{10}$ Schritte Reduktion der CFU, bei einem $\geq 80\%$ Überleben der Keratinozyten) zu definieren [Muehler et al., 2017]. Für den in der vorliegenden Studie verwendeten PS wurde im Dunkeln keine schädlichen Wirkungen gegenüber Bakterien und Zellen festgestellt. In Kombination mit Licht gab es einen breiten effektiven Konzentrationsbereich zwischen 19 μmol und 71 μmol , während für Benzalkoniumchlorid überhaupt kein effektiver Konzentrationsbereich gefunden werden konnte [Muehler et al., 2017]. Dennoch werden weitere Biokompatibilitätsstudien notwendig sein, um die klinische Sicherheit der Phenalen-1-on-vermittelten aPDT zu gewährleisten.

Phenalen-1-One-Mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy and Chlorhexidine Applied to a Novel Caries Biofilm Model

Fabian Cieplik^a Fabian Wimmer^a Denise Muehler^a Thomas Thurnheer^b
Georgios N. Belibasakis^c Karl-Anton Hiller^a Tim Maisch^d Wolfgang Buchalla^a

^aDepartment of Conservative Dentistry and Periodontology, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany; ^bClinic of Preventive Dentistry, Periodontology and Cariology, Division of Oral Microbiology and Immunology, Center for Dental Medicine, University of Zurich, Zurich, Switzerland; ^cDivision of Oral Diseases, Department of Dental Medicine, Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden; ^dDepartment of Dermatology, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany

Keywords

Caries · Chlorhexidine · Phenalen-1-one · Photodynamic therapy · Polymicrobial biofilm · *Streptococcus mutans* ·

Abstract

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) may be useful as a supportive antimicrobial measure for caries-active subjects. In this study, the antimicrobial efficacy of aPDT with a phenalen-1-one photosensitizer was evaluated in a novel *in vitro* biofilm model comprising *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus*, and *Streptococcus mutans* and was compared to chlorhexidine. The proposed biofilm model allows high-throughput screening for antimicrobial efficacy while exhibiting a differentiated response to different antimicrobial approaches. While chlorhexidine 0.2% showed a reduction of $\approx 4 \log_{10}$ for all species, aPDT led to a more pronounced reduction of *S. mutans* ($2.8 \log_{10}$) than of *Actinomyces* spp. (1.2 or $1.3 \log_{10}$). A similar effect was also observed in monospecies biofilms. Therefore, aPDT may be more ef-

fective against *S. mutans* than against *Actinomyces* spp. when in biofilms, and this antimicrobial approach merits further investigations.

© 2018 S. Karger AG, Basel

According to the Global Burden of Disease 2015 study, dental caries was still found to be the most prevalent disease worldwide, affecting about 2.3 billion adults and 560 million children [GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2016], and, accordingly, may be considered as a major economic burden for public health care [Sheiham, 2001]. With regard to the distribution of dental caries, it is well known that there are several disparities by social standing mostly because of differences in diet, fluoride use, and social empowerment, resulting in a sub-population with strong caries incidence [Edelstein, 2006]. Therefore, the development of prevention concepts for these high-risk patients remains a major goal.

In this regard, supportive antimicrobial measures may be useful in daily oral hygiene practice additionally to mechanical removal of biofilms for caries-active patient subgroups [ten Cate, 2009]. The widely used antiseptic of choice is chlorhexidine (CHX), either applied as oral rinse or as gel or varnish [Walsh et al., 2015]. However, its actual impact on caries prevention is debated controversially, and its use exhibits some undesirable side effects like yellow-brown staining of teeth and tongue and altering the sense of taste [Autio-Gold, 2008]. Furthermore, recently, its use has been recommended to be limited to “those applications with a clear patient benefit” (mostly in intensive care) for reducing the risk of inducing acquired resistances to CHX or even cross-resistances to antibiotics in pathogens [Kampf, 2016]. Accordingly, Kitagawa et al. [2016] reported that repeated exposure of *Enterococcus faecalis* to CHX resulted in drug resistance, as demonstrated by increased minimum inhibitory concentrations.

In this instance, antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) may be a promising alternative [Gursoy et al., 2013; Wainwright et al., 2017]. aPDT is a 3-component system, consisting of a per se nontoxic dye (photosensitizer [PS]), light of an appropriate wavelength, and molecular oxygen. When the PS molecule is activated by light, it is transmitted to an excited state, from which there are 2 mechanisms to regain its ground state: in type I mechanism, the charge is transferred to a substrate or molecular oxygen resulting in emergence of oxygen radicals, such as superoxide ions and hydroxyl radicals or hydrogen peroxide. In type II mechanism, energy is transferred to molecular oxygen, resulting in the generation of singlet oxygen (${}^1\text{O}_2$), which is regarded as the most effective reactive oxygen species [Wainwright, 1998; Cieplik et al., 2014; Wainwright et al., 2017]. Hereby, the singlet oxygen quantum yield Φ_Δ describes the proportion of type II mechanism [Maisch et al., 2007]. Due to its unselective mechanism of action, the potential of resistance towards aPDT is very unlikely [Giuliani et al., 2010; Tavares et al., 2010], especially for type II mechanism [Cieplik et al., 2013]. Accordingly, PS based on a phenalen-1-one structure seem to be particularly advantageous due to their high singlet oxygen quantum yield $\Phi_\Delta \geq 0.95$ [Cieplik et al., 2013; Späth et al., 2014; Tabenski et al., 2016]. Furthermore, for oral application, esthetic compromises for patients will not be an issue due to the tooth-like color of phenalen-1-one derivatives [Späth et al., 2014].

However, before any clinical application, it is mandatory to evaluate novel antimicrobial approaches for their efficacy against biofilms, as it is well known that bacteria

embedded in biofilms exhibit strongly enhanced tolerance for antimicrobial challenges as compared to their planktonic counterparts [Marsh, 2004]. Accordingly, it is of vital importance to develop in vitro biofilm models that are easy to operate and allow high-throughput screening of given antimicrobial compounds or approaches.

The aim of the present study was to evaluate the antimicrobial efficacy of phenalen-1-one-mediated aPDT on a novel polymicrobial biofilm model cultured from caries-associated bacteria in vitro in comparison to the gold-standard antiseptic CHX.

Materials and Methods

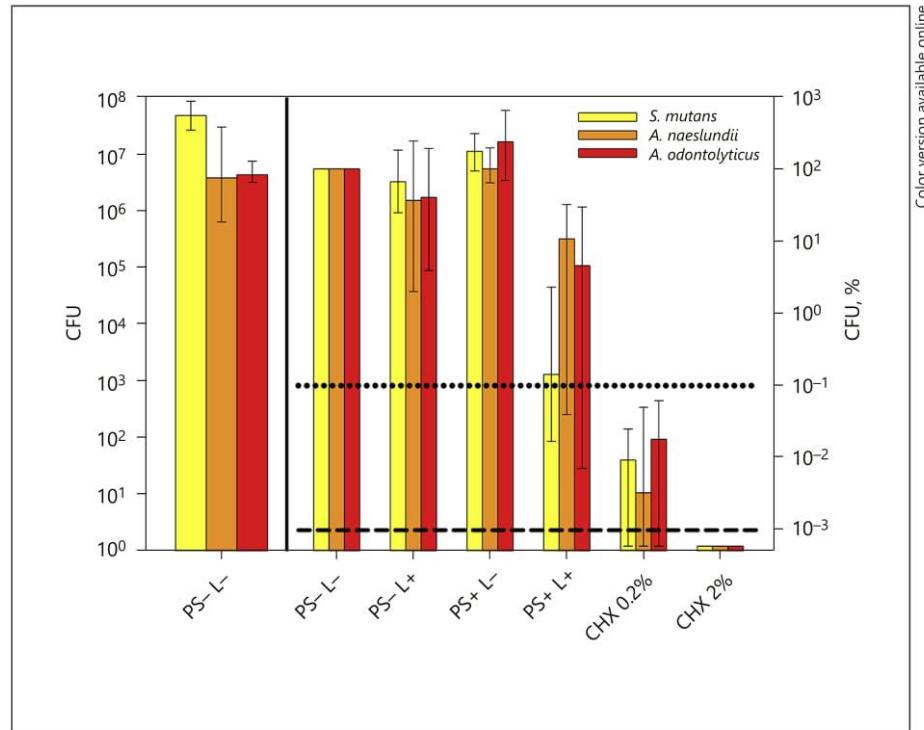
Chemicals and Light Source

The PS used in this study was 2-((4-pyridinyl)methyl)-1H-phenalen-1-one chloride and had been synthetized at the Department of Organic Chemistry (University of Regensburg, Germany), as described earlier in detail (purity $\geq 99\%$) [Cieplik et al., 2013; Späth et al., 2014]. PS suspensions were freshly prepared for the experiments and stored in the dark at 4°C for no longer than 2 weeks. For irradiation of the PS, a gas discharge lamp (Waldmann PIB 3000; Waldmann Medizintechnik, Villingen-Schwenningen, Germany) was employed (λ_{em} 380–600 nm). Irradiance was adjusted to 50 mW/cm^2 at sample level, resulting in an energy dose of 30 J/cm^2 for an irradiation period of 10 min. CHX digluconate dissolved in distilled water was prepared by the pharmacy department of the University Medical Center Regensburg yielding concentrations of 0.2 and 2%.

Bacterial Culture and Biofilm Formation

Three reference strains, *Actinomyces naeslundii* (DSM-43013), *Actinomyces odontolyticus* (DSM-19120), and *Streptococcus mutans* (DSM-20523), were obtained from DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany) to be used in this study. Bacteria were grown and maintained on Columbia Agar plates (provided by the Institute for Microbiology and Hygiene, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany) in a microincubator (MI23NK, SCHOLZEN Microbiology Systems, Necker, Switzerland) under anaerobic conditions (80% N_2 , 10% CO_2 , 10% H_2). Modified Fluid Universal Medium (mFUM) supplemented with 67 mmol/L Sörensen's buffer (pH 7.2) and containing carbohydrate (0.15% [w/v] glucose and 0.15% [w/v] sucrose) was employed as a basal liquid medium [Gmür and Guggenheim, 1983; Guggenheim et al., 2001]. For preparation of planktonic cultures, colonies were picked and suspended in 5 mL of mFUM with 0.5 mL fetal bovine serum (FBS; Gibco® Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 24 h under anaerobic conditions to obtain bacteria in the stationary growth phase. Afterwards, suspensions were harvested by centrifugation (ROTINA 420 R, Hettich Lab Technology, Tuttingen, Germany) and resuspended in mFUM yielding an optical density of 1.0, as measured by means of a spectrophotometer (Ultraspec 3300 pro, Amersham Biosciences, Amersham, UK). Bacterial suspensions were diluted 1:9 in the biofilm culture medium (BCM) consisting of 50% mFUM, 10%

Fig. 1. Antimicrobial efficacy on polyspecies biofilms. All results are shown as medians and neighboring quartiles (25/75% percentiles) depicted on a log₁₀-scaled ordinate. The left panel shows absolute CFU data of untreated control groups (PS- L-) exhibiting overgrowth of *Streptococcus mutans* of $\approx 1 \log_{10}$ as compared to both *Actinomyces* spp. The right panel depicts relative CFU data with untreated controls (groups PS- L-) set to 100%. Horizontal dotted and dashed lines represent CFU reductions of 3 log₁₀ and 5 log₁₀, respectively, as compared to untreated control groups (PS- L-). There was no effect of light (PS- L+) or PS alone (PS+ L-). aPDT (PS+ L+) led to higher CFU reduction of *S. mutans* ($2.8 \log_{10}$) than of *A. naeslundii* ($1.2 \log_{10}$) and *A. odontolyticus* ($1.3 \log_{10}$). CHX 0.2% reduced CFU of *S. mutans* by $4.0 \log_{10}$, CFU of *A. naeslundii* by $4.5 \log_{10}$, and CFU of *A. odontolyticus* by $3.8 \log_{10}$. CHX 2% led to a reduction of CFU by $>6 \log_{10}$ below the detection limit. CFU, colony-forming units; PS, photosensitizer; L, light; aPDT, antimicrobial photodynamic therapy; CHX, chlorhexidine.



Color version available online

FBS, and 40% whole unstimulated human saliva (saliva) that had been pooled from 2 volunteers (authors F.W. and D.M.) and sterile-filtered (pore size: 0.2 µm; Acrodisc® Syringe Filters, Pall Corporation, Newquay, UK).

Polyspecies biofilms were formed in 96-well polystyrene culture plates (Corning® Costar®, Corning, NY, USA). For simulation of pellicle coating, wells were incubated with saliva for 2 h at room temperature. After that, saliva was discarded, and wells were filled with 200 µL of BCM containing *A. naeslundii* and *A. odontolyticus* and incubated under anaerobic conditions. After 16 h, medium was carefully removed and 200 µL fresh BCM containing *S. mutans* was added. After 48 h, a further medium change was performed, and biofilms were incubated for another 24 h.

Formation of monospecies biofilms was performed accordingly: after a 2-h incubation with saliva, wells were filled with 200 µL of BCM containing *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, or *S. mutans*, respectively. Medium changes were after 24 and 48 h. In all cases, the total culture period was 72 h.

Antimicrobial Assay

After 72 h, medium was carefully discarded from the wells and the biofilms were either incubated with phosphate-buffered saline (PBS; Biochrom, Berlin, Germany; groups PS- L-, PS- L+) or PS (groups PS+ L-, PS+ L+), respectively, in the dark for 10 min and then illuminated for another 10 min or incubated with CHX 0.2% or CHX 2% for a total of 20 min (50 µL each). Immediately afterwards, PBS, PS, or CHX was carefully removed, and each biofilm was brought to suspension with 200 µL of PBS and transferred to an Eppendorf tube. These were placed in an ultrasonic water bath chamber (Sonorex Super RK 102 H, Bandelin, Berlin, Germany)

obtaining a frequency of 35 kHz for 10 min and then vortexed (REAX top, Heidolph Instruments, Schwabach, Germany) for 5 s to separate aggregated bacteria. Ten-fold serial dilutions (10⁻² to 10⁻⁷) were prepared in PBS, and aliquots (180 µL) were plated on Columbia blood agar and incubated anaerobically for 72 h. Afterwards, colony-forming units (CFU) were evaluated. For polyspecies biofilms, bacteria on agar plates were differentiated by their respective colony morphology.

Data Analysis

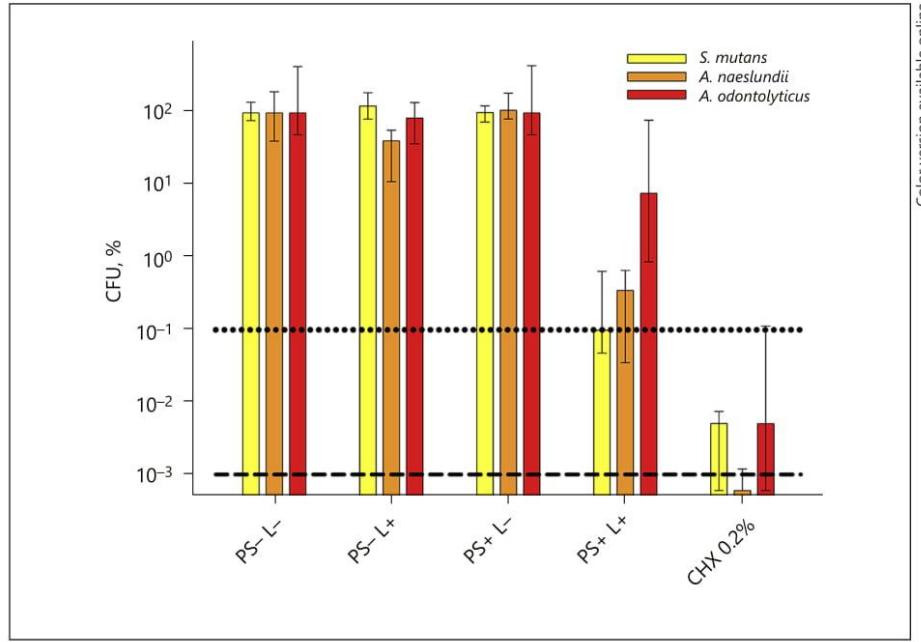
All results are shown as medians and neighboring quartiles (25/75% percentiles) and were calculated using SPSS for Windows, version 23 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), from the values of at least 6 independent experiments, each performed in duplicate. Horizontal dotted and dashed lines represent reductions of 3 and 5 log₁₀ steps of CFU, respectively, compared to the matching untreated control group PS- L-. Medians on or below these lines demonstrate antimicrobial efficacy of at least 99.9% (3 log₁₀) or 99.999% (5 log₁₀), respectively, which is declared as biologically relevant antimicrobial activity or disinfectant effect according to the guidelines of infection control [Boyce and Pittet, 2002].

Results

Antimicrobial Efficacy against Polyspecies Biofilms

Untreated polyspecies biofilms (PS- L-) showed a slight overgrowth of *S. mutans* (4.7×10^7) of $\approx 1 \log_{10}$ step as compared to *A. naeslundii* (3.8×10^6) and *A. odonto-*

Fig. 2. Antimicrobial efficacy on monospecies biofilms. All results are shown as medians and neighboring quartiles (25/75% percentiles) depicted on a \log_{10} -scaled ordinate as relative CFU data with the respective untreated controls (groups PS- L-) set to 100%. Horizontal dotted and dashed lines represent CFU reductions of $3 \log_{10}$ and $5 \log_{10}$, respectively, as compared to the respective untreated control groups (PS- L-). There was no effect of light (PS- L+) or PS alone (PS+ L-). aPDT (PS+ L+) led to CFU reductions of $3.0 \log_{10}$ for *S. mutans* biofilms, while CFU in *A. naeslundii* and *A. odontolyticus* biofilms were reduced by $2.5 \log_{10}$ or $1.1 \log_{10}$, respectively. CHX 0.2% reduced CFU in *S. mutans* and *A. odontolyticus* biofilms by $4.3 \log_{10}$ and in *A. naeslundii* biofilms by $6.0 \log_{10}$. CFU, colony-forming units; PS, photosensitizer; L, light; aPDT, antimicrobial photodynamic therapy; CHX, chlorhexidine.



Color version available online

lyticus (4.3×10^6). The left panel of Figure 1 shows absolute CFU values of untreated controls, while the right panel depicts relative CFU data with untreated controls (groups PS- L-) set to 100%.

aPDT reduced CFU of *S. mutans* ($2.8 \log_{10}$) more than CFU of *A. naeslundii* and *A. odontolyticus* (1.2 or $1.3 \log_{10}$, respectively), while treatment with PS (PS+ L-) or light alone (PS- L+) had no effect. CHX 0.2% reduced CFU of all species by $\approx 4 \log_{10}$ steps (*S. mutans*: $4.0 \log_{10}$; *A. naeslundii*: $4.5 \log_{10}$; *A. odontolyticus*: $3.8 \log_{10}$), while CHX 2% led to eradication by $>6 \log_{10}$ below the detection limit.

Antimicrobial Efficacy against Monospecies Biofilms

Untreated monospecies biofilms (groups PS- L-) showed growth of 2×10^8 , 4×10^7 , and 1×10^6 CFU for *S. mutans*, *A. naeslundii*, and *A. odontolyticus*, respectively. Figure 2 shows relative CFU data with untreated controls (groups PS- L-) set to 100%.

CFU reductions for aPDT (PS+ L+) were $3.0 \log_{10}$ for *S. mutans*, while *A. naeslundii* and *A. odontolyticus* were reduced by $2.5 \log_{10}$ or $1.1 \log_{10}$ only. In contrast, CHX 0.2% led to reduction rates of $4.3 \log_{10}$ for *S. mutans* and *A. odontolyticus*, while CFU of *A. naeslundii* were reduced by $6.0 \log_{10}$. Treatment with PS (PS+ L-) or light only (PS- L+) had no effect in any cases.

Discussion

The aim of the present study was to investigate the antimicrobial efficacy of phenalen-1-one-mediated aPDT as compared to the gold-standard antiseptic CHX for inactivation of biofilms from cariogenic bacteria in vitro. For this purpose, a novel biofilm model for high-throughput screening of antimicrobial approaches was established comprising *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, and *S. mutans*. *A. naeslundii* is considered to be an essential early colonizer in dental plaque [Dige et al., 2009], while *A. odontolyticus* is suggested to be a key organism mediating adhesion and co-aggregation in supragingival plaque [Tang et al., 2003] and is associated with high caries incidence in children [ElSalhy et al., 2016]. *S. mutans* is well known to play a major role in the pathogenesis of dental caries, mostly due to its ability to produce an insoluble polymeric matrix and due to its acidogenic and aciduric properties [Klein et al., 2015].

The culture conditions for this biofilm model have been modified from the Zurich biofilm model of supragingival plaque originally described by Guggenheim et al. [2001]: instead of pasteurization of human saliva, filter sterilization was employed because the latter is deemed to be preferable in terms of protein integrity [Ruhl et al., 2011]. Furthermore, concentrations of carbohydrates in mFUM were changed from 0.15% glucose to 0.15% sucrose and 0.15% glucose each, since *S. mutans* requires

sucrose for glucosyltransferase-mediated synthesis of exopolysaccharides [Kreth et al., 2008; Koo et al., 2010], while *Actinomyces* spp. preferentially utilize glucose for their metabolism via the Embden-Meyerhof-Parnas pathway [Takahashi and Yamada, 1999]. Proportions of mFUM, saliva, and FBS in the BCM were adjusted to 50, 40, and 10%, respectively, for increasing biofilm density and sturdiness [Ammann et al., 2012]. In contrast to the Zurich biofilm model, biofilms were cultured in 96-well plates rather than on hydroxyapatite discs placed in 24-well plates for ensuring optimal experimental conditions for antimicrobial evaluation of light-based approaches like aPDT. Otherwise, biofilms growing on both sides of the hydroxyapatite discs may have impeded standardized irradiation procedures. Biofilm culture was started with *A. naeslundii* and *A. odontolyticus*, while *S. mutans* was added after 24 h of culture for preventing outgrowth of this species with respect to the slower cell division of *Actinomyces* spp. relative to streptococci [Dige et al., 2009]. Accordingly, it was recently shown that, when *Streptococcus oralis* is absent, *S. mutans* dominates the Zurich biofilm at the expense of *Actinomyces oris* [Thurnheer and Belibasakis, 2018]. Furthermore, *S. mutans* colonizes *in vitro* much less efficiently on streptococcal biofilms than on *A. naeslundii* biofilms [Wang et al., 2011].

As compared to the Zurich biofilm model of supragingival plaque and its various modifications comprising up to 11 bacterial or fungal species [Guggenheim et al., 2001; Shapiro et al., 2002; Ammann et al., 2012; Belibasakis and Thurnheer, 2014], this biofilm model is less complex in terms of species diversity but, on the other hand, allows easy and high-throughput screening while still being robust to antimicrobial challenge. Treatment with CHX 2.0% for 20 min served as a positive control leading to total eradication of biofilm bacteria below detection limit. In contrast, treatment with CHX 0.2% resulted in a reduction of $\approx 4 \log_{10}$ steps, while shorter treatment periods exhibited substantially lower inactivation rates (data not shown). This is in line with the literature, where Wilson [1996] reported no antimicrobial effect of CHX 0.2% after treating 72-h old *S. mutans* biofilms for 5 min but eradication by $>6 \log_{10}$ below detection limit after treatment for 60 min. Likewise, Voos et al. [2014] found inactivation of $\approx 1 \log_{10}$ after treating biofilms formed *in situ* with CHX 0.2% for 3 min, while Hoogenkamp et al. [2009] showed $\approx 2 \log_{10}$ inactivation of *S. mutans* biofilms after treatment for 5 min. In general, there is a strong and crucial correlation between treatment period and antimicrobial efficacy, especially when it comes to biofilms [Mah and O'Toole, 2001; Stewart and Costerton, 2001]. Diffu-

sion of given antimicrobials into deeper layers of the biofilm may be hampered or slowed by interaction of these positively charged molecules with the negatively charged residues of the biofilm's extracellular polymeric substance [Thurnheer et al., 2003; Tseng et al., 2013]. Therefore, shorter treatment periods may just lead to killing of bacteria in the superficial layers of the biofilm, as it has been shown in the classic study by Zaura-Arite et al. [2001].

Treatment with aPDT led to less pronounced inactivation rates as compared to CHX. *S. mutans* was inactivated by $2.8 \log_{10}$, while *A. naeslundii* and *A. odontolyticus* exhibited killing rates of 1.2 or $1.3 \log_{10}$ only. It is noteworthy to say that despite an identical total treatment period of 20 min (10 min of incubation in the dark followed by 10 min of irradiation), the period of antimicrobial activity of aPDT is limited to the time when the light is switched on. Interestingly, although aPDT is known to be an unselective antimicrobial approach [Wainwright et al., 2017], *S. mutans* exhibited noticeably higher susceptibility to phenalen-1-one-mediated aPDT as compared to both *A. naeslundii* and *A. odontolyticus*. The influence of subsequent addition of *S. mutans*, potentially leading to only superficial colonization of this species within the biofilm, can be ruled out because, in this instance, *S. mutans* would have been inactivated more severely than both *Actinomyces* spp. in the CHX groups, too. The higher susceptibility of *S. mutans* to aPDT was further substantiated by investigating antimicrobial efficacy in monospecies biofilms of all 3 species. Likewise, aPDT showed higher inactivation efficacy in *S. mutans* biofilms ($3.0 \log_{10}$) as compared to *A. naeslundii* ($2.5 \log_{10}$) and *A. odontolyticus* ($1.1 \log_{10}$) biofilms. These results are in contrast to a previous study where aPDT with the same PS as used in the present study resulted in a $6.5 \log_{10}$ inactivation against *A. naeslundii* monospecies biofilms [Cieplik et al., 2015]. However, this difference in antimicrobial efficacy may be due to employing a distinct strain (*A. naeslundii* T14V) and due to the longer incubation period (25 min) [Cieplik et al., 2015], again elucidating the crucial impact of treatment period.

Actinomyces spp. are generally known for their thick and robust cell walls, which are resistant to salivary lysozyme and other peptidoglycan-hydrolyzing enzymes [Delisle et al., 2006]. Therefore, the higher tolerance to aPDT may be due to an insufficient permeability for PS molecules through the cell membrane, as suggested by Dige et al. [2009] as a cause for the irregular distribution of fluorescent signals when applying FISH to *A. naeslundii*. Furthermore, *Actinomyces* spp. tend to cluster together

er [Dige et al., 2009] and may even be encapsulated by streptococci, as it has been proposed by Bos et al. [1996].

To the best of our knowledge, there are no other reports in the literature on the effects of aPDT on polymicrobial biofilms formed in vitro from caries-associated species, such as *S. mutans* and *Actinomyces* spp. Therefore, the higher tolerance of *Actinomyces* spp. to phenalen-1-one-mediated aPDT found here may justify more detailed investigation in future studies, e.g., by using flow cytometry for the investigation of membrane alterations. This phenomenon merits further investigation, as it may be utilized clinically by repeated application of aPDT to induce a shift from highly cariogenic streptococci-dominated to less cariogenic *Actinomyces*-dominated microbiota in caries-active patients, which may be an interesting approach for biofilm modulation in view of the ecological plaque hypothesis [Marsh et al., 2015].

However, before any clinical application of phenalen-1-one-mediated aPDT, potential harmful effects on mammalian tissues must be ruled out. As a first step, in a recent study, aPDT with several phenalen-1-one derivatives was investigated for its antimicrobial efficacy in planktonic cultures of dermal pathogens and for its eukaryotic toxicity for keratinocytes as compared to the biocide benzalkonium chloride in order to evaluate a potentially effective concentration range (i.e., $\geq 5 \log_{10}$ steps reduction of CFU while $\geq 80\%$ survival of keratinocytes [Muehler et al., 2017]. For the PS used in the present study, no harmful effects were found in the dark. In combination with light, there was a broad effective concentration range, while for benzalkonium chloride no effective concentration range could be found at all [Muehler et al., 2017]. Although these results are encouraging, further biocompatibility studies will be necessary to establish the clinical safety of phenalen-1-one-mediated aPDT.

Conclusion

In this study, a novel caries biofilm model is described comprising *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, and *S. mutans*, which allows easy and high-throughput screening of given compounds or approaches while exhibiting sturdiness towards antimicrobial challenges. While treatment with CHX 0.2% inactivated all species by $\approx 4 \log_{10}$ steps, phenalen-1-one-mediated aPDT led to more pronounced inactivation of *S. mutans* ($2.8 \log_{10}$) as compared to *A. naeslundii* ($1.2 \log_{10}$) and *A. odontolyticus* ($1.3 \log_{10}$), which was similarly found in monospecies biofilms.

Acknowledgement

This study was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (German Research Foundation; CI 263/1-1). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Franziska Angermeier and Sara Wennige are gratefully acknowledged for their valuable help in the initial stages of this study.

Disclosure Statement

All authors declare that they have no conflicts of interest.

Author Contributions

F.C., T.M., and W.B. conceived and designed the experiments. T.T. and G.N.B. helped setting up the biofilm model. F.W. and D.M. performed the experiments. F.C., F.W., D.M., K.-A.H., T.M., and W.B. analyzed the data. F.C. wrote the manuscript with input from all authors. All authors reviewed the manuscript.

References

- Ammann TW, Gmür R, Thurnheer T: Advancement of the 10-species subgingival Zurich biofilm model by examining different nutritional conditions and defining the structure of the in vitro biofilms. *BMC Microbiol* 2012; 12:227.
- Autio-Gold J: The role of chlorhexidine in caries prevention. *Oper Dent* 2008;33:710–716.
- Belibasakis GN, Thurnheer T: Validation of antibiotic efficacy on in vitro subgingival biofilms. *J Periodontol* 2014;85:343–348.
- Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ: Co-adhesion of oral microbial pairs under flow in the presence of saliva and lactose. *J Dent Res* 1996;75:809–815.
- Boyce JM, Pittet D: Guideline for hand hygiene in health-care settings: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;23:3–40.
- Cieplik F, Pummer A, Regensburger J, Hiller K-A, Späth A, Tabenski L, et al: The impact of absorbed photons on antimicrobial photodynamic efficacy. *Front Microbiol* 2015;6:706.
- Cieplik F, Späth A, Regensburger J, Gollmer A, Tabenski L, Hiller K-A, et al: Photodynamic biofilm inactivation by SAPYR – an exclusive singlet oxygen photosensitizer. *Free Radic Biol Med* 2013;65:477–487.
- Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T: Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol* 2014;5:405.
- Delisle AL, Barcak GJ, Guo M: Isolation and expression of the lysis genes of *Actinomyces naeslundii* phage Av-1. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:1110–1117.
- Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B: *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiology* 2009; 155:2116–2126.
- Edelstein BL: The dental caries pandemic and disparities problem. *BMC Oral Health* 2006; 6(suppl 1):S2.

- ElSalhy M, Söderling E, Honkala E, Fontana M, Flannagan S, Kokaras A, et al: Salivary microbiota and caries occurrence in Mutans Streptococci-positive school children. *Eur J Paediatr Dent* 2016;17:188–192.
- GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators: Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016;388:1545–1602.
- Giuliani F, Martinelli M, Cocchi A, Arbia D, Fantetti L, Roncucci G: In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:637–642.
- Gmür R, Guggenheim B: Antigenic heterogeneity of *Bacteroides intermedius* as recognized by monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1983; 42:459–470.
- Guggenheim B, Giertsen E, Schüpbach P, Shapiro S: Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 2001;80: 363–370.
- Gursoy H, Ozcakir-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S: Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Investig* 2013;17: 1113–1125.
- Hoogenkamp MA, Crielaard W, ten Cate JM, Wever R, Hartog AF, Renirie R: Antimicrobial activity of vanadium chloroperoxidase on planktonic *Streptococcus mutans* cells and *Streptococcus mutans* biofilms. *Caries Res* 2009;43:334–338.
- Kampf G: Acquired resistance to chlorhexidine – is it time to establish an “antiseptic stewardship” initiative? *J Hosp Infect* 2016;94:213–227.
- Kitagawa H, Izutani N, Kitagawa R, Maezono H, Yamaguchi M, Imazato S: Evolution of resistance to cationic biocides in *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*. *J Dent* 2016;47:18–22.
- Klein MI, Hwang G, Santos PHS, Campanella OH, Koo H: *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol* 2015;5:10.
- Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG: Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol* 2010;192:3024–3032.
- Kreth J, Zhu L, Merritt J, Shi W, Qi F: Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:213–219.
- Mah T-FC, O'Toole GA: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001;9:34–39.
- Maisch T, Baier J, Franz B, Maier M, Landthaler M, Szeimies R-M, et al: The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:7223–7228.
- Marsh PD: Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 2004;38:204–211.
- Marsh PD, Head DA, Devine DA: Ecological approaches to oral biofilms: control without killing. *Caries Res* 2015;49(suppl 1):46–54.
- Muehler D, Sommer K, Wennige S, Hiller K-A, Cieplik F, Maisch T, et al: Light-activated phenalen-1-one bactericides: efficacy, toxicity and mechanism compared with benzalkonium chloride. *Future Microbiol* 2017;12:1297–1310.
- Ruhl S, Berlenbach P, Langenfelder S, Hörl D, Lehn N, Hiller K-A, et al: Integrity of proteins in human saliva after sterilization by gamma irradiation. *Appl Environ Microbiol* 2011;77: 749–755.
- Shapiro S, Giertsen E, Guggenheim B: An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Res* 2002;36:93–100.
- Sheiham A: Dietary effects on dental diseases. *Public Health Nutrition* 2001;4:569–591.
- Späth A, Leibl C, Cieplik F, Lehner K, Regensburger J, Hiller K-A, et al: Improving photodynamic inactivation of bacteria in dentistry: highly effective and fast killing of oral key pathogens with novel tooth-colored type-II photosensitizers. *J Med Chem* 2014;57:5157–5168.
- Stewart PS, Costerton JW: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358:135–138.
- Tabenski I, Cieplik F, Tabenski L, Regensburger J, Hiller K-A, Buchalla W, et al: The impact of cationic substituents in phenalen-1-one photosensitizers on antimicrobial photodynamic efficacy. *Photochem Photobiol Sci* 2016;15: 57–68.
- Takahashi N, Yamada T: Glucose and lactate metabolism by *Actinomyces naeslundii*. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:487–503.
- Tang G, Yip HK, Samaranayake LP, Luo G, Lo EC, Teo CS: *Actinomyces* spp. in supragingival plaque of ethnic Chinese preschool children with and without active dental caries. *Caries Res* 2003;37:381–390.
- Tavares A, Carvalho CM, Faustino MA, Neves MG, Tomé JP, Tomé AC, et al: Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar Drugs* 2010;8: 91–105.
- ten Cate BJM: The need for antibacterial approaches to improve caries control. *Adv Dent Res* 2009;21:8–12.
- Thurnheer T, Belibasakis GN: *Streptococcus oralis* maintains homeostasis in oral biofilms by antagonizing cariogenic pathogen *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol* 2018, DOI: 10.1111/omi.12216.
- Thurnheer T, Gmür R, Shapiro S, Guggenheim B: Mass transport of macromolecules within an in vitro model of supragingival plaque. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:1702–1709.
- Tseng BS, Zhang W, Harrison JJ, Quach TP, Song JL, Penterman J, et al: The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environ Microbiol* 2013;15:2865–2878.
- Voos AC, Kranz S, Tonndorf Martini S, Voelpel A, Sigusch H, Staudte H, et al: Photodynamic antimicrobial effect of safranin O on an ex vivo periodontal biofilm. *Lasers Surg Med* 2014;46:235–243.
- Wainwright M: Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 1998;42:13–28.
- Wainwright M, Maisch T, Nonell S, Plaetzter K, Almeida A, Tegos GP, et al: Photoantimicrobials – are we afraid of the light? *Lancet Infect Dis* 2017;17:e49–e55.
- Walsh T, Oliveira-Neto JM, Moore D: Chlorhexidine treatment for the prevention of dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;4:CD008457.
- Wang BY, Deutch A, Hong J, Kuramitsu HK: Proteases of an early colonizer can hinder *Streptococcus mutans* colonization in vitro. *J Dent Res* 2011;90:501–505.
- Wilson M: Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol* 1996;44:79–87.
- Zaura-Arite E, Marle J, ten Cate JM: Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 2001; 80:1436–1440.

Danksagung

Zuallererst bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Buchalla für die freundliche Überlassung dieses außerordentlich interessanten Themas bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Fabian Cieplik für die Betreuung dieser Arbeit. Er ermöglichte diese erst und begleitete sie stets mit fachlichem Rat, kompetenter Kritik und wertvollen Ergänzungen. Seine freundliche Hilfe und Ideengebung waren mir ausnahmslos eine Unterstützung und ich bin und werde immer sehr dankbar dafür sein.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Karl-Anton Hiller bedanken. Unermüdlich und stets zuvorkommend half er bei der Auswertung statistischer Daten. Unzählige Konversationen bezüglich der Versuche und konstruktiver Austausch eröffneten mir einen kritischen Zugang zu dieser Thematik

Ferner danke ich Herrn Prof. Tim Maisch für die freundschaftliche Begleitung und sachbringenden Gespräche während der Durchführung der Versuche. Seine Fachkompetenz im Bereich Mikrobiologie prägten meine Ansichten maßgeblich.

Mein weiterer Dank gilt Frau Denise Mühler, welche mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mir auch außerhalb der Klinik eine sehr gute Freundin war.

Frau Viktoria-Sophia Steinwachs möchte ich auch meinen besonderen Dank aussprechen. Durchgehend begleitete sie mich während meinen Versuchen und war immer hilfsbereit, humorvoll, und lebensfroh an meiner Seite. Ohne sie wäre diese Arbeit in der Form nicht

möglich gewesen. Dafür und für ihre Freundschaft möchte ich mich bedanken.

Auch Prof. Helmut Schweikl gebührt mein Dank. Insbesondere für interessante Einblicke in die doch sehr komplizierte Welt der Biochemie.

Darüber hinaus möchte ich mich bei dem gesamten Forschungslabor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie und speziell bei Claudia Waha, Helga Ebensberger, Gerlinde Ferstl und Christine Petzel für die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Fabian Wolfgang Wimmer
Geburtsdatum:	29.01.1993
Geburtsort:	Zwiesel
Familienstand:	ledig

Schulischer Werdegang

1999 – 2003	Grundschule Kirchdorf
2003 – 2005	Gymnasium Zwiesel
2005 – 2009	Realschule Regen
2009 – 2011	FOS Regen
2011 – 2012	FOS Deggendorf

Studium

2012 – 2013	Studium der Physik Universität Regensburg
2013 – 2018	Studium der Zahnmedizin Universität Regensburg
04/2014	Naturwissenschaftliche Vorprüfung (Note: sehr gut)
09/2015	Zahnärztliche Vorprüfung (Note: sehr gut)
02/2018 – 06/2018	Zahnärztliche Prüfung (Note: sehr gut)
07/2018	Approbation als Zahnarzt

Literaturverzeichnis

- Ammann TW, Gmür R, Thurnheer T: Advancement of the 10-species subgingival Zurich biofilm model by examining different nutritional conditions and defining the structure of the in vitro biofilms. *BMC Microbiol* 2012; 12: 227.
- Autio-Gold J: The role of chlorhexidine in caries prevention. *Oper Dent* 2008; 33: 710–716.
- Belibasakis GN, Thurnheer T: Validation of antibiotic efficacy on in vitro subgingival biofilms. *J Periodontol* 2014; 85: 343–348.
- Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ: Co-adhesion of oral microbial pairs under flow in the presence of saliva and lactose. *J Dent Res* 1996; 75: 809–815.
- Boyce JM, Pittet D: Guideline for hand hygiene in health-care settings: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23: 3–40.
- Cieplik F, Pummer A, Regensburger J, Hiller K-A, Späth A, Tabenski L, et al: The impact of absorbed photons on antimicrobial photodynamic efficacy. *Front Microbiol* 2015; 6: 706.
- Cieplik F, Späth A, Regensburger J, Gollmer A, Tabenski L, Hiller K-A, et al: Photodynamic biofilm inactivation by SAPYR – an exclusive singlet oxygen photosensitizer. *Free Radic Biol Med* 2013; 65: 477–487.
- Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T: Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol* 2014; 5: 405.
- Delisle AL, Barcak GJ, Guo M: Isolation and expression of the lysis genes of *Actinomyces naeslundii* phage Av-1. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 1110–1117.
- Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B: *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiology* 2009; 155: 2116–2126.
- Edelstein BL: The dental caries pandemic and disparities problem. *BMC Oral Health* 2006; 6 (suppl 1): S2.
- El Salhy M, Söderling E, Honkala E, Fontana M, Flannagan S, Kokaras A, et al: Salivary microbiota and caries occurrence in Mutans Streptococci-positive school children. *Eur J Paediatr Dent* 2016; 17: 188–192.

- GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators: Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016; 388: 1545–1602.
- Giuliani F, Martinelli M, Cocchi A, Arbia D, Fantetti L, Roncucci G: In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 637–642.
- Gmür R, Guggenheim B: Antigenic heterogeneity of *Bacteroides intermedius* as recognized by monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1983; 42: 459–470.
- Guggenheim B, Giertsen E, Schüpbach P, Shapiro S: Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 2001; 80: 363–370.
- Gursoy H, Ozcakir-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S: Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Investig* 2013; 17: 1113–1125.
- Hoogenkamp MA, Crielaard W, ten Cate JM, Wever R, Hartog AF, Renirie R: Antimicrobial activity of vanadium chloroperoxidase on planktonic *Streptococcus mutans* cells and *Streptococcus mutans* biofilms. *Caries Res* 2009; 43: 334–338.
- Kampf G: Acquired resistance to chlorhexidine – is it time to establish an “antiseptic stewardship” initiative? *J Hosp Infect* 2016; 94: 213–227.
- Kitagawa H, Izutani N, Kitagawa R, Maezono H, Yamaguchi M, Imazato S: Evolution of resistance to cationic biocides in *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*. *J Dent* 2016; 47: 18–22.
- Klein MI, Hwang G, Santos PHS, Campanella OH, Koo H: *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 5: 10.
- Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG: Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol* 2010; 192: 3024–3032.
- Kreth J, Zhu L, Merritt J, Shi W, Qi F: Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 213–219.
- Mah T-FC, O’Toole GA: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9: 34–39.
- Maisch T, Baier J, Franz B, Maier M, Landthaler M, Szeimies R-M, et al: The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc Natl*

Acad Sci USA 2007; 104: 7223–7228.

- Marsh PD: Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 2004; 38: 204–211.
- Marsh PD, Head DA, Devine DA: Ecological approaches to oral biofilms: control without killing. *Caries Res* 2015; 49(suppl 1): 46–54.
- Muehler D, Sommer K, Wennige S, Hiller K-A, Cieplik F, Maisch T, et al: Light-activated phenalen-1-one bactericides: efficacy, toxicity and mechanism compared with benzalkonium chloride. *Future Microbiol* 2017; 12: 1297– 1310.
- Ruhl S, Berlenbach P, Langenfelder S, Hörl D, Lehn N, Hiller K-A, et al: Integrity of proteins in human saliva after sterilization by gamma irradiation. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 749–755.
- Shapiro S, Giertsen E, Guggenheim B: An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Res* 2002; 36: 93–100.
- Sheiham A: Dietary effects on dental diseases. *Public Health Nutrition* 2001; 4: 569–591.
- Späth A, Leibl C, Cieplik F, Lehner K, Regensburger J, Hiller K-A, et al: Improving photodynamic inactivation of bacteria in dentistry: highly effective and fast killing of oral key pathogens with novel tooth-colored type-II photosensitizers. *J Med Chem* 2014; 57: 5157– 5168.
- Stewart PS, Costerton JW: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358: 135– 138.
- Tabenski I, Cieplik F, Tabenski L, Regensburger J, Hiller K-A, Buchalla W, et al: The impact of cationic substituents in phenalen-1-one photosensitizers on antimicrobial photodynamic efficacy. *Photochem Photobiol Sci* 2016; 15: 57–68.
- Takahashi N, Yamada T: Glucose and lactate metabolism by *Actinomyces naeslundii*. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10: 487–503.
- Tang G, Yip HK, Samaranayake LP, Luo G, Lo EC, Teo CS: *Actinomyces* spp. in supragingival plaque of ethnic Chinese preschool children with and without active dental caries. *Caries Res* 2003; 37: 381–390.
- Tavares A, Carvalho CM, Faustino MA, Neves MG, Tomé JP, Tomé AC, et al: Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar Drugs* 2010; 8: 91–105.
- ten Cate BJM: The need for antibacterial approaches to improve caries control. *Adv Dent Res* 2009; 21: 8–12.

- Thurnheer T, Belibasakis GN: Streptococcus oralis maintains homeostasis in oral biofilms by antagonizing cariogenic pathogen Streptococcus mutans. Mol Oral Microbiol 2018, DOI: 10.1111/omi.12216.
- Thurnheer T, Gmür R, Shapiro S, Guggenheim B: Mass transport of macromolecules within an in vitro model of supragingival plaque. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 1702–1709.
- Tseng BS, Zhang W, Harrison JJ, Quach TP, Song JL, Penterman J, et al: The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. Environ Microbiol 2013; 15: 2865–2878.
- Voos AC, Kranz S, Tonndorf Martini S, Voelpel A, Sigusch H, Staudte H, et al: Photodynamic antimicrobial effect of safranine O on an ex vivo periodontal biofilm. Lasers Surg Med 2014; 46: 235–243.
- Wainwright M: Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). J Antimicrob Chemother 1998; 42: 13–28.
- Wainwright M, Maisch T, Nonell S, Plaetzer K, Almeida A, Tegos GP, et al: Photoantimicrobials – are we afraid of the light? Lancet Infect Dis 2017; 17:e49–e55.
- Walsh T, Oliveira-Neto JM, Moore D: Chlorhexidine treatment for the prevention of dental caries in children and adolescents. Cochrane Database Syst Rev 2015; 4:CD008457.
- Wang BY, Deutch A, Hong J, Kuramitsu HK: Proteases of an early colonizer can hinder *Streptococcus mutans* colonization in vitro. J Dent Res 2011; 90: 501–505.
- Wilson M: Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. J Med Microbiol 1996; 44: 79–87.
- Zaura-Arite E, Marle J, ten Cate JM: Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. J Dent Res 2001; 80: 1436–1440.
- Ormond, A.B.; Freeman, H.S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. Materials 2013, 6, 817-840.
- Angermeier, F: Etablierung eines polymikrobiellen Biofilmmodells aus kariogenen Bakterienspezies *in vitro* – Dissertationsschrift Zahnmedizin, Regensburg 2018