

Aus der Klinik und den Polikliniken für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
Abteilung für Parodontologie
in der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Universität Würzburg
Leiter: Prof. Dr. med. dent. Ulrich Schlagenhaut

**Antibakterielle Wirksamkeit
von Taurolidin als Kompositsuspension in vitro**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität
zu
Würzburg

Vorgelegt durch
Jan Dierfeld

Würzburg, April 2008

Referent: Prof. Dr. med. dent. Ulrich Schlagenhaut

Koreferent: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2008

Der Promovend ist Zahnarzt.

Für meine Eltern und Geschwister

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Problemstellung.....	1
1.1 Definition und Entstehung oraler Biofilme.....	1
1.2 Chemotherapie in der Mundhöhle.....	5
1.2.1 Chlorhexidin.....	6
1.2.2 Taurolidin (Taurolin).....	8
2 Ziel der Studie.....	12
3 Material und Methode.....	13
3.1 Prinzipielles Studiendesign.....	13
3.2 Methode.....	13
3.2.1 Eigenschaften des Adhäsivkomposits OptiBond FL.....	13
3.2.2 Übersicht Versuchsaufbau.....	15
3.2.3 Versuchsgrundlagen.....	16
3.2.3.1 Herstellung verwendeter Puffer und Medien.....	16
3.2.3.2 Herstellung der Probenkörper.....	17
3.2.4 Vorversuche.....	18
3.2.4.1 Agardiffusionstest.....	18
3.2.4.2 Vorversuche zur Färbung mit dem Sybr-Green-1-Farbstoff.....	19
3.2.4.3 Vorversuche mit der Gram-Färbung.....	20
3.2.4.4 Vorversuche mit WST-1-Reagens.....	20
3.2.4.5 Wachstumsversuche.....	22
3.2.4.6 Verschiedene Parameter.....	22
3.2.5 Versuche.....	23
3.2.5.1 Vorkultur.....	23
3.2.5.2 Beimpfen der Plättchen.....	24
3.2.5.3 Der WST-Test.....	24
3.2.6 Auswertung.....	24
3.2.6.1 Rohdatenerfassung.....	24
3.2.6.2 Statistik.....	25
4 Ergebnisse.....	26
4.1 Ergebnisse der Vorversuche.....	26

4.1.1 Ergebnisse des Agardiffusionstests.....	26
4.1.2 Ergebnisse mit dem DNA-Farbstoff Sybr-Green-1.....	27
4.1.3 Ergebnisse der Gramfärbung.....	28
4.2 Ergebnisse der Hauptversuche.....	28
4.2.1 Ergebnisse der 1. Versuchsreihe.....	30
4.2.2 Ergebnisse der 2. Versuchsreihe.....	32
4.2.3 Ergebnisse der 3. Versuchsreihe.....	34
4.2.4 Ergebnisse der 4. Versuchsreihe.....	36
4.3 Statistik.....	38
5 Diskussion.....	39
5.1 Material.....	39
5.1.1 Titan als Versuchsoberfläche.....	39
5.2 Methode.....	39
5.2.1 Biofilmmodell.....	39
5.2.2 Versuchsaufbau.....	40
5.2.3 Auswertung.....	40
5.3 Ergebnisse.....	41
5.3.1 Vorversuche.....	41
5.3.1.1 Sybr-Green-1.....	41
5.3.1.2 WST-1-Reagens.....	42
5.3.1.3 Vorversuche.....	42
5.3.2 Hauptversuch.....	43
5.3.2.1 Bonding.....	43
5.3.2.2 Ergebnisse des Hauptversuchs.....	44
6 Zusammenfassung.....	46
7 Literaturverzeichnis.....	47
8 Anhang.....	55
8.1 Verwendete Bakterienstämme.....	55
8.2 Verwendete Geräte.....	55
8.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	56
8.4 Verwendete Chemikalien.....	57

Abkürzungsverzeichnis

AHL	N-Acyl-Homoserin-Laktone
Bis GMA	Bisphenol glycidyl methacrylat
CFU	Colony forming units (Kolonien formende Einheiten)
CHX	Chlorhexidindigluconat
EZP	extrazelluläres Polysaccharid
GDMA	Glycerol dimethacrylat
HEMA	2-Hydroxyethylmethacrylat
LPS	Lipopolysaccharid
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PS	Polystyrol
RAU	relative absorption unit
Rpm	Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Definition und Entstehung oraler Biofilme

Karies und Parodontitis gehören in der heutigen Bevölkerung zu den am weitesten verbreiteten Infektionskrankheiten. Ursache für beide Erkrankungen sind von bakteriellen Biofilmen ausgehende Infektionen [9,22]. Biofilme sind die in der Natur vorherrschende Lebensform von Bakterien. Natürliche Biofilme bestehen aus einer meist sehr komplexen Ansammlung von in eine Matrix aus Polysacchariden eingebetteter Mikroorganismen. Sie entstehen in der Regel an den Grenzflächen zwischen wässrigem und festem Milieu [8, 7, . Stoffwechsel und Verhalten von Keimen in diesen häufig polymikrobiellen Lebensgemeinschaften unterscheiden sich wesentlich von denen der einzeln planktonisch lebenden Organismen.

Der erste Schritt zur bakteriellen Biofilmbildung ist die initialphysikalisch vermittelte Anhaftung eines Einzelkeims an einer Oberfläche. Diese induziert innerhalb von Minuten eine Änderung der Genexpression in der Zelle [34]. Damit werden den Bakterien veränderte Eigenschaften zuteil. Eine wichtige, in Biofilmen verstärkte Fähigkeit ist die der Kommunikation untereinander, was als „quorum sensing“ bezeichnet wird. Die Transmitter für die Zell-Zell-Signalvermittlung sind zumeist N-Acyl-Homoserin-Laktone (AHL). Sie sind amphiphil und können damit leicht die Zellmembran penetrieren. Liegt das Quorum-Sensing-Molekül (AHL) in ausreichender Konzentration vor, werden in den umgebenden Zellen Gene aktiviert, die das Verhalten der Zelle verändern. So wird zum Beispiel das Wachstum reguliert, die Aufnahme zellfremder DNA stimuliert, oder die Anhaftung oder Ablösung von Bakterien geregelt [28].

Wie in Abb. 1 dargestellt, beginnt ein Biofilm als lose Ansammlung von Bakterien. Um sie herum ist noch kein Polysaccharid als Matrix angelagert. An die Primärkolonien der Pionierbakterien lagern sich weitere Keime an und formen schließlich komplexe Strukturen von einer Stärke bis zu 300 Zellschichten. Das Volumen dieser Komplexe besteht nur zu 10-50% aus

Bakterien und zu 50-90 Volumenprozent aus Matrixmaterial in Form von extrazellulären Polysacchariden (EzP) [7, 28, 30].

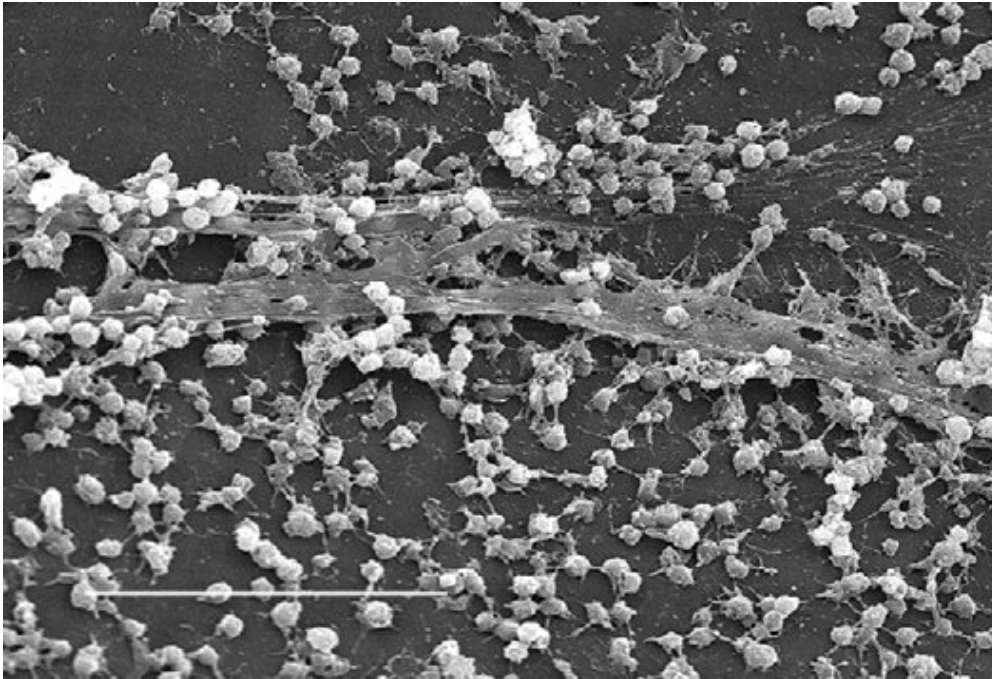


Abb. 1: Beginnender Biofilm. - Elektronenmikroskopische Aufnahme einer beginnenden, von Staphylokokken geprägten Biofilmbildung an der Innenseite eines Medizinproduktes (Messbalken = 20µm) (Lipincott Williams & Wilkins)

Die Matrix dient sowohl als Nahrungsreservoir, als auch als Schutz und zur mechanischen Befestigung und Stabilisierung der Kolonie. Die strukturellen Untereinheiten bleiben dabei die Mikrokolonien der Bakterien, die in älteren Lebensgemeinschaften auch als Mischkolonien existieren und, welche in die amorphe Matrix, in Gruppen zusammen liegen [31]. Es entstehen „Türme“ und „Pilze“, die wie in einem Korallenriff von Flüssigkeit konvektiv durchströmt werden [9, 34]. Dadurch wird sichergestellt, dass potentiell wachstumsbegrenzende Faktoren wie Nährstoffe und Sauerstoff immer in ausreichender Menge vorhanden sind und Abfallprodukte entfernt werden. Abbildung 2 zeigt, dass die Struktur der Kolonien am ehesten als ein hochelastischer Wald turmartiger Strukturen beschrieben werden kann. Diese Biofilmstrukturen besitzen die Fähigkeit, Scherkräften, die aus Flüssigkeitsbewegungen resultieren, durch elastische Deformation standzuhalten.

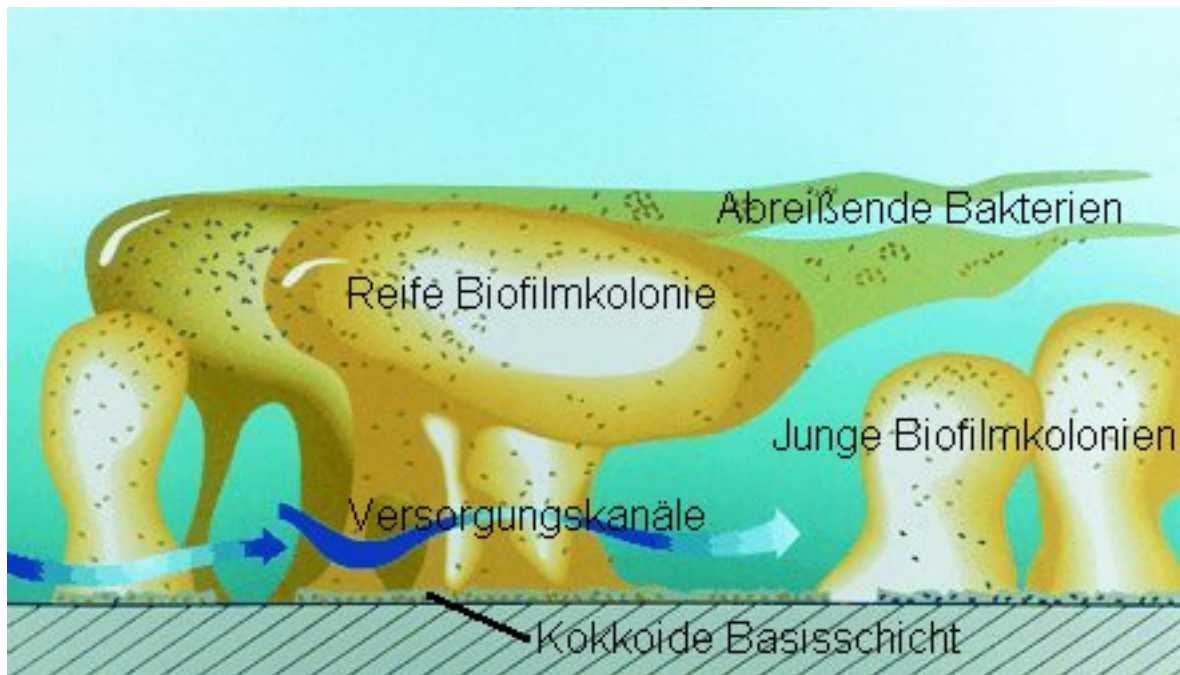


Abb. 2: Biofilmstruktur. - Schematische Darstellung eines Ausschnittes aus einem reifen Biofilm (Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, Montana)

Biofilme, die auf stark umströmten Oberflächen entstehen, haben eine sehr elastische Matrixstruktur. Ohne mechanischen Stress entstehende Kolonien brechen bei plötzlich auftretender Belastung auseinander. Die Dicke des Filmes ist ebenfalls variabel und richtet sich gleichfalls nach der Strömungsgeschwindigkeit des umgebenden Mediums. Umfließt das Medium die Kolonien langsam, bildet sich ein relativ weicher, dicker Biofilm aus. Steigt die Strömungsgeschwindigkeit, wachsen weniger Bakterien auf, welche besser im EZP verankert sind [28, .

Eine aktuelle Definition beschreibt den Biofilm als irreversibel sesshaft gewordene Bakterienkolonien, die sich an spezielle Bindungsstellen einer Oberfläche angeheftet haben. Bindungsstellen an die Oberfläche sind unter anderem Proteine, zum Beispiel des Pellikels, des so genannten Zahnoberhäutchens. Es entsteht aus Speichelproteinen (prolinreichen Peptiden (PRPs) u.a.), die sich der Zahnoberfläche auflagern. Für diese Oberflächenproteine besitzen orale Keime, beispielsweise Streptokokken, einen spezifischen Bindungsmechanismus. Abbildung 3 zeigt, dass in einem

nachfolgenden Stadium Bakterien in eine selbst produzierte extrazelluläre Matrix aus polymeren Substanzen eingebettet sind. In Wachstumsrate und Gentranskription unterscheiden sie sich zu diesem Zeitpunkt signifikant vom Phänotyp der planktonischen Wachstumsform [7, 28].

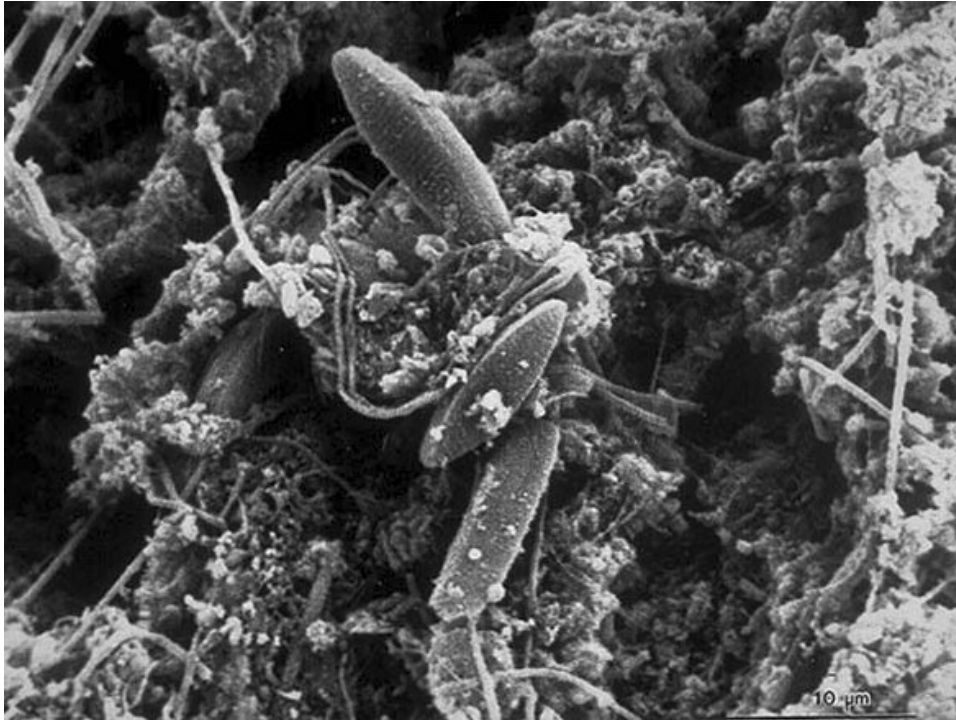


Abb. 3: Reifer Biofilm. - Elektronenmikroskopische Aufnahme eines mikrobiellen Biofilms, welcher innerhalb von acht Wochen auf der Stahloberfläche eines industriellen Wasserleitungssystems entstanden ist (American Society for Microbiology, Microbe Library)

In der Mundhöhle werden bakterielle Biofilme auch als Plaque bezeichnet. Die Beläge sind nicht überall gleich strukturiert und zusammengesetzt, sondern unterscheiden sich räumlich im Mund des Individuums. Schon auf einzelnen Zähnen sind erhebliche Unterschiede festzustellen: Supragingivale Plaque ist grundlegend anders aufgebaut, als subgingivale, von Anaerobiern dominierte Beläge. Neben den räumlichen Strukturunterschieden verändert sich der Biofilm im Verlauf der verschiedenen Lebensabschnitte. Beispielsweise ist die Bakterienflora beim zahnlosen Säugling grundlegend verschieden zu der eines bezahnten Erwachsenen oder eines unbezahnten, prothesentragenden alten Menschen [13]. Die bakterielle Lebensform, die organisiert als eigenes Ökosystem betrachtet werden kann, weist erstaunliche Eigenschaften auf, die nicht nur in der Zahnmedizin, sondern auch in der Medizin - auf Oberflächen

von Implantaten, Herzklappen oder Kathetern - den Behandler vor erhebliche therapeutische Probleme stellen [11].

Die Bakterien im Ökosystem Biofilm haben eine weit höhere Resistenz gegen antimikrobielle Stoffe. Mechanismen für die erhöhte Resistenz der Bakterien im Biofilm gegen Bakterizide und Antibiotika beruhen auf einer erschwerten Penetration des antibakteriellen Wirkstoffes durch die Matrix, eine verringerte Wachstums- und Teilungsrate der Bakterien, sowie anderen physiologischen Veränderungen aufgrund des Biofilmwachstums, wie z.B. einem reichhaltigen Nährstoffangebot oder dem Vorhandensein inaktivierender Enzyme bakteriellen Ursprungs [5, 6, 7, 8, 12]. Diese Resistenz steigt mit zunehmendem Alter des intakten Biofilms. Außerdem haben Studien gezeigt, dass Konjugation (Austausch von Resistenzgenen auf Plasmiden) in Biofilmen weitaus häufiger und einfacher geschieht als bei planktonisch wachsenden Zellen [32, 33].

Die Besiedelung der Zähne durch Bakterien läuft immer nach einem bestimmten Schema ab: Die Zahnoberfläche wird zuerst von Streptokokken, genauer von *S. sanguinis* besiedelt, welche besondere Adhäsionseigenschaften an das peptidische Zahnoberhäutchen (Pellicel) besitzen. Die Kokken binden über die Produktion extrazellulärer Glykane direkt an das Pellicel und bereiten den Boden für nachfolgende Bakterienarten wie beispielsweise Laktobazillen, Aktinomyzeten, Prevotellen, Captnocytophagen, Propionibakterien und Veillonellen, welche zum Teil sehr spezifisch an diese Pionierkeime binden [4, 3]. So bildet sich im Verlauf von Wochen ein reifer, gut organisierter Biofilm aus. Er entwickelt sich bevorzugt an relativ „geschützten“ Stellen der Mundhöhle, wie Approximalräumen und Gingivalsulkus. Mit der Ausreifung und der Zunahme der Schichtdicke versagen der körpereigenen Kompensations- und Puffermechanismen immer mehr [7].

1.2 Chemotherapie in der Mundhöhle

Neben der mechanischen Entfernung bakterieller Biofilme kann das mikrobielle Wachstum in der Mundhöhle auch durch Einbringen antibakterieller Stoffe inhibiert werden.

Ein orales Chemotherapeutikum muss folgenden Anforderungen entsprechen: Breites Wirkspektrum, keine Selektion resistenter Keime, keine klinisch relevanten Nebenwirkungen [14], keine Allergisierung, annehmbarer Geschmack und ein Haftmechanismus, der den Stoff über längere Zeit in der Mundhöhle verweilen lässt. Chemotherapeutika werden als Mundspüllösungen, Gele oder auch als Lacke eingesetzt. In der Regel erreicht ihre antibakterielle Wirkung nur supragingivale und sulkuläre Flächen des Zahnes. Antibakterielle Chemotherapeutika können in 5 Kategorien eingeteilt werden:

- I. Antibiotische Substanzen, die unspezifisch auf die Inhibition der Proliferation von Bakterien oder deren Abtötung ausgelegt sind.
- II. Antibiotische Substanzen, die fähig sind, spezifisch eine bestimmte Gruppe von Bakterien zu hemmen oder abzutöten.
- III. Enzyme oder Enzymkombinationen, welche die Struktur des Biofilms aufbrechen oder dessen Aktivität verändern können.
- IV. Nicht enzymatische Stoffe, welche die Struktur oder Aktivität des Biofilms zu ändern vermögen.
- V. Substanzen, welche die Anheftung von Mikroorganismen an das Pellicle stören [15].

Die gebräuchlichsten kommerziell erhältlichen oralen Chemotherapeutika sind:

- Bis-Biguanide
- Bis-Pyridine
- Halogene
- Kräuterextrakte
- Oxygenierende Substanzen
- Phenole
- Pyrimidine
- Quartenäre Ammoniumsalze
- Schwermetallsalze

1.2.1 Chlorhexidin

Der Goldstandard unter den klinisch genutzten oralen Chemotherapeutika ist die zu den Bis-Biguaniden zählende Substanz Chlorhexidindigluconat (CHX).

Das CHX-Molekül besteht aus zwei Phenolringen mit je einer 4-Cl-Gruppe und jeweils einer Biguanidgruppe, die über eine Hexamethylenkette symmetrisch miteinander verbunden sind [17].

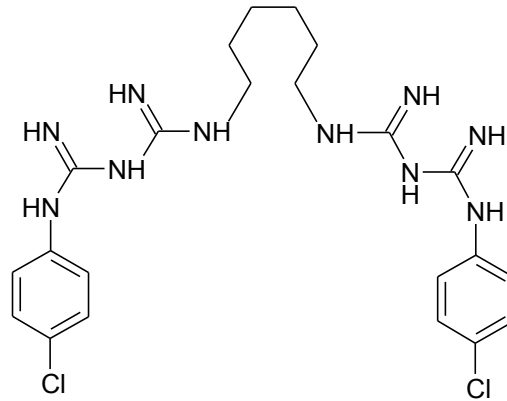


Abb. 4: Strukturformel des Chlorhexidins

Vorteile des CHX sind die starke, nicht selektive Toxizität auf Bakterien nach kurzer Einwirkzeit und in geringen Konzentrationen sowie die durch die positive Ladung verursachte starke Haftung an oralen Oberflächen (Substantivität). Durch die stark kohäsive Bindung in der Mundhöhle wird der Wirkstoff nach der Anwendung kontinuierlich freigesetzt und besitzt so eine lang anhaltende antibakterielle Wirkung [15]. Die antimikrobielle Wirkung entsteht, wie bei vielen anderen kationischen Stoffen, durch starke Bindung an die Bakterienmembran. Es wird eine Permeabilitätserhöhung der Membran induziert. Der intrazelluläre Raum erfährt dadurch Elektrolytverschiebungen und Präzipitation intrazellulärer Bestandteile. Der Stoffwechsel des Bakteriums kommt zum Erliegen. Durch diesen generalisierten Störmechanismus hat CHX ein sehr breites antimikrobielles Spektrum [18, 19]. Es greift nicht wie ein Antibiotikum spezifisch in den Bakterienstoffwechsel ein, sondern ist durch den Angriff auf die Zellmembran unselektiv und bietet damit sehr wenig Angriffsfläche für Resistenzentwicklung. Nachteile sind Geschmacksstörungen und Verfärbungen der Zähne bei längerer Anwendung. In vitro wird das Wachstum von Fibroblasten ab einer Wirkstoffkonzentration von 0,005% CHX reversibel, ab 0,12% irreversibel gehemmt. Außerdem wurden bereits bei 0,002% Chlorhexidinlösung die Zahl der ausgesäten Zellen reduziert [19]. Chlorhexidin

wirkt damit nicht nur bakterizid, sondern kann auch wachstumshemmend bis zytotoxisch auf körpereigene Zellen wirken. In vitro Versuche mit Chlorhexidin verdeutlichten die Toxizität des Wirkstoffes auf Fibroblasten und Epithelzellen [19, 20, 21]. In vivo angewendete, höhere Konzentrationen zeigten jedoch nicht diesen Effekt: Im Speichel enthaltene Serumbestandteile wie Fibrin schützen die Zellen vor der zytotoxischen Wirkung des Chlorhexidins [19]. Es ist bekannt, dass Eiter und Blut Chlorhexidin inaktivieren [22]. Resümierend ist CHX auch heute noch der anerkannte Standard der oralen Chemotherapeutika, allerdings mit starken Einschränkungen bezüglich der Biokompatibilität auf offenen Wunden und dem Auftreten klinisch nicht akzeptabler Nebenwirkungen in der Langzeitanwendung.

1.2.2 Taurolidin (Taurolin)

Taurolidin ist ein Stoff, welcher ebenfalls nicht selektive bakterizide Eigenschaften besitzt, jedoch im Gegensatz zu Chlorhexidin einer längeren Einwirkzeit bedarf. Aufgrund der nur schwachen Haftung an Schleimhautoberflächen und Zähnen kommt es nach Applikation zu einer raschen Wirkungsverminderung, so dass herkömmliche Lösungen für die orale Anwendung nicht verwendbar sind. Taurolidin entsteht aus der Aminosulfonsäure Taurin, welche ubiquitär im Körper vorkommt. Es besitzt eine geringe Toxizität auf den Körper und wird über den normalen Aminosäurestoffwechsel abgebaut. Taurolidin wirkt besonders auf anaerob wachsende Bakterien [45]; je saurer das umgebende Milieu, desto stärker ist die Wirkung. Eine weitere wichtige Eigenschaft ist, dass freies Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien sehr gut gebunden wird und so die Aktivierung des Komplementsystems, mit der möglichen Folge eines toxischen Schocks, verhindert werden kann.

Chemisch handelt es sich bei Taurolidin um ein Bis(1,1-dioxo-perhydro-1,2,4-thiadiazinyl-4)-Methan. Es wird an vielen Stellen im Körper synthetisiert, ist aber besonders häufig in Leukozyten, Thrombozyten, im Herzmuskel und im Gehirn zu finden. Synthetisiert wird es aus dem Ausgangsstoff Taurin der über die

Zwischenstufe Taurinamid zum Taurolidin führt. Abbildung 5 zeigt die Strukturformel des Taurolidinmoleküls.

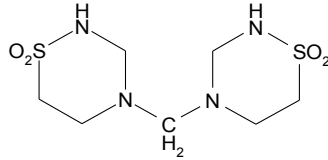


Abb. 5: Strukturformel des Taurolidins.

In wässrigem Milieu zerfällt Taurolidin als Gleichgewichtsreaktion zum Teil zu Methyloltaurultam und Taurultam.

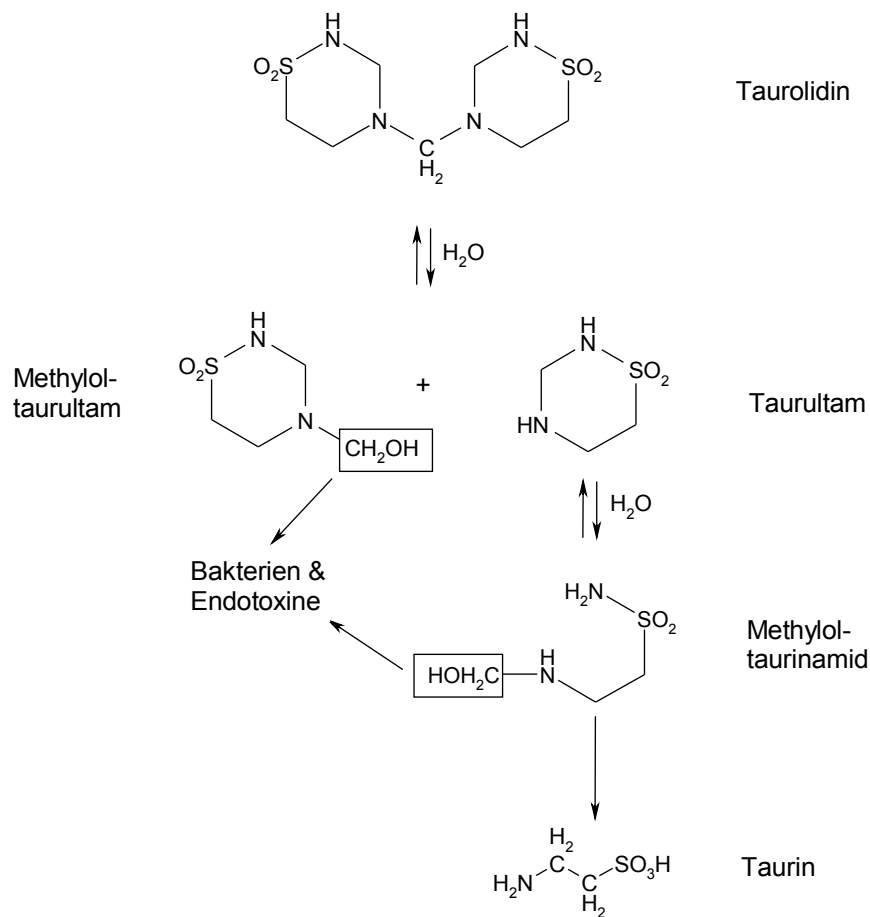


Abb. 6: Reaktionsgleichung. - Reaktionsgleichgewicht von Taurolidin in Wasser.

Frühere Diskussionen, wonach die Wirksamkeit des Taurolidins auf der metabolischen Spaltung mit der Freisetzung von Formaldehyd beruht, wurden widerlegt [23, 24]. Auch eine kanzerogene Aktivität kann ausgeschlossen

werden. Taurolidin und seine Metabolite sind unter physiologischen Bedingungen nicht lipophil genug, um in den Zellkern vordringen zu können [35].

Die Wirkung des Taurolidins beruht auf der Reaktion des Hydroxymethylderivates mit den Mureinen der Zellwand von Bakterien unter Freisetzung der Stufen Taurinamid und Taurin. Taurolidin tötet Bakterien in vitro innerhalb von 15-30 Minuten ab und liegt damit über der international festgesetzten Grenze von 5 Minuten für Antiseptika wie z.B. alkoholische Händedesinfektionen. Es gehört vielmehr, analog zum Chlorhexidin, in die nächsthöhere Kategorie der antimikrobiellen Chemotherapeutika. In vivo ist Taurolidin jedoch, aufgrund der Ringöffnung durch körpereigene Enzyme und damit vermehrter Bildung aktiver Metabolite, besser wirksam als in vitro. Es wirkt antibakteriell, hindert Bakterien an der Oberflächenadhäsion und bindet LPS. Damit ist es ein effektives Mittel gegen LPS-verursachte Symptomatiken wie das Toxic-Shock-Syndrome und Peritonitis.

Zum Erreichen konstant hoher Konzentrationen wurden Antibiotika in den operativen Disziplinen als Spüllösungen, in Knochenzemente gemischt oder in PMMA-Ketten gebunden eingesetzt. Der Gebrauch eines Antibiotikums auf einem nicht resorbierbaren Träger machte dessen Entfernung nach der Therapie notwendig. Taurolidin birgt hier den Vorteil das es, eingesetzt als resorbierbares Gel oder Knochenersatzmaterial, diesen zweiten operativen Eingriff unnötig macht.

Nachdem bekannt war, dass Taurolidin Endotoxin effektiv inaktiviert, wurden zunächst tierexperimentelle Studien zu klinischen Problemsituationen wie Peritonitis, septischen Schock oder infizierten Hautdefekten unternommen. Aufgrund diesbezüglich ermutigender Ergebnisse wurde Taurolidin nachfolgend auch zur Infektprophylaxe bei Operationen verwendet. In einer Studie von Lob und Burri [36] wurden 2 Gruppen mit jeweils fast 4000 Operationen verglichen, bei welchen mit dem Antibiotikum Nebactin oder mit Taurolidin gespült wurde. Nach den durchgeführten Operationen (Osteosynthesen, Osteotomien, Arthrodesen, operative Revisionen von Tumoren und Pseudarthrosen) zeigte

sich kein statistisch verifizierbarer Unterschied in der postoperativen Infektionsrate. Diese lag für Taurolidin bei 0,53%.

In der Osteitistherapie wird Taurolidin vor allem als 4%iges resorbierbares Gel verwendet, dessen Matrix denaturiertes Kollagen enthält. Nach mikrobiologischer Identifizierung der infektiösen Keime und operativem Einbringen von 4%igem Taurolidin-Gel gelang es Lob, Burri und Ulrich [37], fast alle Osteitiden in einen ruhenden Zustand zu überführen (per Definitionem wird hier nicht von einer Heilung gesprochen).

Auch wurden in der Viszeralchirurgie gute Erfolge verzeichnet. Eine peritoneale Entzündung nach einem Durchbruch von Magen oder Darmabschnitten wird von verschiedenen Bakterien, grampositiven und -negativen, Aerobiern und Anaerobiern verursacht. Das macht eine Therapie des Infektes mit nur einem Antibiotikum sehr schwer. Hier wurden gute Ergebnisse mit der Kombination von Antibiotika i.v. und Taurolidin als Peritonealspülung erzielt. Eine ausschließliche Therapie mit Taurolidin erbrachte eine Sterblichkeitsrate bei Peritonitis von 21% [38] und wird heute als alleinige Therapie für nicht sinnvoll erachtet [39]. Taurolin hat als Adjuvans den Vorteil des unspezifischen Wirkmechanismus auf die Bakterienwand, mit dem es die Wirksamkeit des Antibiotikums unterstützen und dessen Lücken im Wirkspektrum schließen kann.

Heute wird Taurolidin vor allem bei Kathetertherapien wie zentralen Venenkathetern, in Dialysesystemen und bei Urethalkathetern im Lumen belassen [40, 41]. Als Lösung mit Heparin oder Citrat beugt es der Biofilmbildung vor, hilft die Sterilität des Zuganges zu bewahren und dessen Durchgängigkeit zu sichern [44].

Neueste Studien konzentrieren sich nicht mehr nur auf die antibakterielle Wirkung, sondern haben ein neues Feld in der Tumorthherapie erschlossen. Taurolidin verringert signifikant die Ausschüttung von Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-1 β aus aktivierten Makrophagen. Diese beiden Stoffe sind essentiell für die Angiogenese im Entzündungsgebiet. Taurolidin hemmt aktiv die Entstehung neuer Gefäßbetten. Damit fehlt dem Tumor der entscheidende Faktor zum Wachstum, nämlich die Nähr- und Sauerstoffversorgung [42, 43].

2 Ziel der Studie

Aufgrund der primär unbefriedigenden Substantivität von Taurolidin in der Mundhöhle war es das Ziel, in einem *in vitro* Modell zu untersuchen, welche antibakterielle und antiadhäsive Wirkung Taurolidinmoleküle zeigen, die in einer organischen Trägermatrix gebunden sind.

3 Material und Methode

3.1 Prinzipielles Studiendesign

Alle Versuche wurden *in vitro* mittels normierter Reintitanplättchen durchgeführt, auf die Taurolidin in unterschiedlichen Konzentrationen aufgebracht wurde, welches in eine organische Matrix aus dem kommerziell erhältlichen Dentinadhäsiv OptiBond FL (Firma Kerr, Orange, USA) eingebunden war. Diese derart beschichteten Versuchsplättchen wurden standardisiert mit Streptokokken und Staphylokokken überschichtet.

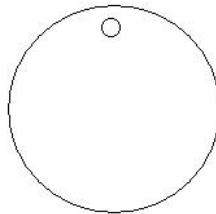


Abb. 7: Probenträgerskizze.

3.2 Methode

3.2.1 Eigenschaften des Adhäsivkomposits OptiBond FL

Aufgrund seiner geringen Substantivität ist für Taurolidin ein Vehikel notwendig, mit dem es am Zahn befestigt werden kann, um ein ausreichendes Zeitfenster für die Entwicklung der antibakteriellen Wirksamkeit zur Verfügung zu stellen. Als Matrix wurde der Haftvermittler OptiBond FL Bonding (Firma Kerr, USA), ein Komposit mit niedriger Viskosität, ausgewählt, da dieses einfach anzuwenden und leicht zu fixieren ist. Hierbei handelt es sich um eine Suspension mehrerer organischer Monomere und nichtorganischer Füllstoffe. Enthaltene Siliziumpartikel sollen die Schrumpfung verringern und die mechanische Belastbarkeit erhöhen.

Der dentale Verbundkunststoff OptiBond FL enthält:

- 25,7% Bis GMA
- 19,2% HEMA
- 6,5% GDMA
- 42,2% Ba-Al-Borsilikatglas
- 2,6% Silikatglas
- 1,9% Na_2SiF_6
- 0,3% Kampferchinon

Vor allem HEMA zeigte in *in vitro* Studien, dass die Monomere stark zytotoxische und genotoxische Aktivität aufweisen [25, 28]. Diese führt durch Chromosomenschädigung der DNA zur Abnahme von antioxidativen Stress-Proteinen, was wiederum zum Zelltod durch Apoptose führen kann. Der genaue Weg, welcher zum Zelltod führt, ist noch immer unbekannt.

Durch die amphiphile Struktur ist HEMA das am stärksten freigesetzte Monomer aus nicht polymerisierten Adhäsivmaterialien [27]. Die Stärke der Zelltoxizität des Monomers korreliert mit der Menge der Freisetzung [26]. Neuere Untersuchungen zur Zytotoxizität dentaler Materialien zeigen, dass die Freigabe radikaler Monomere aus polymerisierten Materialien jedoch so gering ist, dass die Konzentration der Monomere nicht zellschädigend wirksam wird [26].

In der Zahnmedizin wird der Haftvermittler normalerweise für die Füllung von kariösen Defekten mit der Komposittechnik verwendet. Der Zahnschmelz wird mit 35-prozentiger Phosphorsäure behandelt. Dadurch entsteht ein mikrokristallines Relief im Zahnschmelz. Im Dentin wird durch Entkalkung das Kollagenfasernetz freigelegt. In dieses freigelegte Kollagen und das Schmelzätzmuster setzen sich amphiphile, penetrierfreudige Methacrylate des Primers. Verbliebene Wasserreste werden verdrängt und die Oberfläche ist für das hydrophobe Komposit des leichtfließenden Haftvermittlers vorbereitet. Nach Aushärtung des Bondings ist die Oberfläche zur Kompositbeschichtung im mikromechanischen Verbund bereit.

3.2.2 Übersicht Versuchsaufbau

Alle Versuchsreihen wurden an Bakterienmonokulturen in Flüssigmedium durchgeführt. Für die Vorversuche wurden *Staphylococcus epidermidis* und *Streptococcus sanguinis* verwendet. Die Hauptversuchsreihen wurden mit *Streptococcus mutans* (DSM 20523) durchgeführt. *S. mutans* wurde als in der Ätiologie der Karies bedeutsamer Keim ausgewählt, der durch homogene Ausbildung von Polysacchariden erhöhte Anhaftungswerte an Oberflächen erreicht und damit besonders für die Zielstellung dieser Arbeit geeignet war.

In einem in vitro Aufbau wurde das Aufwachsen von *S. mutans* auf mit Adhäsiv beschichteten und nichtbeschichteten Titanplättchen untersucht. Diese Probenkörper wurden in der hauseigenen Werkstatt hergestellt. Sie hatten einen Durchmesser von 15,5 mm, eine Dicke von 0,6 mm und besaßen eine randständige Bohrung. Diese diente der Reinigung der Körper im Ultraschallbad. Die Maße entsprachen dem Innendurchmesser kommerziell erhältlicher 24-Well-Platten.

Nach der Reinigung wurden die Titanplättchen, vor Einlegen in die Schalen, in einer Verdünnungsreihe mit Adhäsiv bzw. Adhäsiv-Taurolidin-Gemisch beschichtet. Das Gemisch wurde durch Abwiegen der Zutaten auf einer Feinwaage und anschließendes Vermengen in der Vertiefung einer Kompositpalette (Vivapad, Ivoclar Vivadent GmbH, Ellwangen) hergestellt. Die Verdünnungen betragen als Massenbestandteile 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 Teile Taurolidinpulver zu Adhäsivkomposit. Nach 20 Sekunden Polymerisation pro Plättchen mit der LED-Polymerisationslampe Elipar-Free-Light (3M Espe AG, Seefeld) wurden die Plättchen in standardisierter Reihenfolge systematisch in die Vertiefungen der Well-Schale eingelegt. Auf den Prüfkörpern wurden die Testkeime 22 Stunden kultiviert und die antibakterielle Wirksamkeit über den WST-Test ausgewertet.

Von den zu verwendenden Keimen wurde eine Übernachtskultur aus der aufgetauten Glycerinkultur in Kulturmedium (Thioglykolat) hergestellt. Aus dieser wurde eine definierte Menge entnommen und in frisches Medium überführt. Nach 2 Stunden wurden die Prüfkörper mit jeweils 1,5 ml dieser Bakteriensuspension beimpft. So sollte die Vermehrung der Bakterien im

aufsteigenden Bereich der logarithmischen Wachstumskurve genutzt werden. Nach weiteren 22 Stunden Bebrütung wurde das Kulturmedium mittels einer Pumpe abgesaugt und die WST-Testung durchgeführt. Der WST-Farbstoff wird von Enzymen der Atmungskette umgebaut und zeigt so einen Farbumschlag von magenta nach gelb, der dann photometrisch als Differenz zum Nullwert gemessen werden kann. So kann die relative Menge der noch vorhandenen und stoffwechselaktiven Bakterien nachgewiesen werden.

3.2.3 Versuchsgrundlagen

3.2.3.1 Herstellung verwendeter Puffer und Medien

Tab. 1: Herstellung von PBS-Puffer (Phosphate buffered saline) – PBS ist eine Phosphat gepufferte, isotonische Kochsalzlösung. Die Zutaten wurden auf der Heizplatte mittels Magnetrührer im Reinstwasser gelöst. Nach vollständiger Auflösung wurde das Nährmedium autoklaviert.

8,0g Natriumchlorid NaCl
0,2g Kaliumhydrogenphosphat KH_2PO_4
2,8g Dinatriumhydrogenphosphat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
0,2g Kaliumchlorid KCl
1000ml Reinstwasser
20 Minuten bei 121°C autoklavieren

Tab. 2: Herstellung von LB-Nährmedium – Die Zutaten wurden auf der Heizplatte mittels Magnetrührer im Reinstwasser gelöst. Nach vollständiger Auflösung wurde das Nährmedium autoklaviert.

5g Hefeextrakt
10g Tryptone
5g Natriumchlorid NaCl
1000ml Reinstwasser
20 Minuten bei 121°C autoklavieren

Herstellung BBL-Schädler-Nährmedium

28,4g des in Pulverform vorliegenden Fertigmediums wurden in 1l Reinstwasser gegeben, unter Rühren erhitzt und dann für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert.

Herstellung des Thioglykolat-Nährmediums

29,8g des in Pulverform vorliegenden Fertigmediums wurden in 1l Reinstwasser gegeben, unter Rühren erhitzt und dann für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert.

3.2.3.2 Herstellung der Probenkörper

Zur Reinigung der noch unbehandelten Probenkörper wurden die Plättchen einem Säuberungsprozess im Ultraschallbad unterzogen. Dazu wurden jeweils 10 Plättchen mittels der randständigen Bohrung an speziell hergestellten Haltevorrichtungen berührungsfrei in ein 500 ml fassendes Becherglas gehängt. Dieses wiederum wurde nacheinander mit den verschiedenen Reinigungsflüssigkeiten gefüllt. Das Becherglas wurde in ein Ultraschallbad gestellt und die Plättchen so von Rückständen gereinigt. Die Reinigung wurde standardisiert nach folgendem Schema durchgeführt:

Tab. 3: Reinigungsschema im Ultraschallbad.

Medium	Zeit
2 % Natriumlaurylsulfat – Lösung (sodiumdodecylsulfate; SDS)	15 min
Reinstwasser	10 min
5% Extranlösung (Tensid)	10 min
2x Reinstwasser	10 min
β-Isopropanol	10 min
Reinstwasser	10 min

So wurde eine fast 100% reine, nicht polierte Oberfläche der Titanplättchen erreicht und vorhandene Verunreinigungen entfernt. Nach dem Waschvorgang wurden die Plättchen mit einer Pinzette entnommen und jeweils acht Plättchen gemeinsam in Sterilisationstüten eingeschweißt. Anschließend wurden sie im Autoklaven bei 121° für 20 Minuten sterilisiert.

3.2.4 Vorversuche

3.2.4.1 Agardiffusionstest

Bevor Wachstumsversuche in der Nährbouillon vorgenommen wurden, sollte die Diffusionsfähigkeit und damit die Freisetzung des Wirkstoffes aus dem Kompositverbund heraus getestet werden. Dies geschah anhand eines Agardiffusionstests mit den beschichteten Proben. Sie wurden, wie weiter unten beschrieben, in den Konzentrationen 1:2 und 1:4 beziehungsweise nur mit Bonding beschichtet hergestellt. Am Vortag der Testung wurden mehrere Blutagarplatten mit *Staph. epidermidis* beimpft und diese für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank belassen. Von den massiv bewachsenen Agarplatten wurden mit sterilen Wattetupfern so viele Kolonien abgenommen und in physiologische NaCl-Lösung gegeben, dass eine Trübung entstand, die 0,5 optischer Dichte nach McFarland entsprach. Diese Methode stellt über die Trübung der Suspension eine Relation zur Anwesenheit von Kolonien formenden Einheiten (CFU) her. Bei 0,5 McFarland sind circa 1×10^8 CFU/ml vorhanden.

Die beschichteten Plättchen wurden 30 Sekunden lang in destilliertem Wasser gewaschen, um an der Oberfläche liegende, nicht diffundierte Taurolidinreste zu entfernen. Dann wurden die Probenkörper mittig auf die 9,5 cm Durchmesser messenden Blutagarplatten aufgelegt. Der Wirkstoff lag nach unten, im Kontakt zur Agaroberfläche. Es folgte eine weitere 24-stündige Bebrütung der Platten bei 37°C.

3.2.4.2 Vorversuche zur Färbung mit dem Sybr-Green-1-Farbstoff

Die Färbung der Proben mit dem DNA Farbstoff Sybr-Green-1 gestaltete sich zunächst schwierig. Durch die erforderliche Alkoholtrocknungsreihe löste sich die Kunststoffschicht von der Oberfläche des Probenträgers ab. Durch Sandstrahlen des Titans entstand eine retentive Oberfläche, die derjenigen angeätzten Schmelzes ähnelt und so einen stabilen Verbund schaffte. Das Versuchsschema für das Aufwachsen der Bakterien war dasselbe, wie unten in den Wachstumsversuchen beschrieben.

Zur Färbung der Probenträger mit Sybr-Green-1 wurde zuerst das Medium abgezogen und das Plättchen zweimal in Folge mit jeweils 2 ml PBS-Pufferlösung beschickt. Dann wurde das PBS abgesaugt und 3,7% Formaldehyd zur Fixierung der Bakterien für 10 Minuten auf die Proben gegeben. Nach Absaugen des Formaldehyds wurden wiederum 2 ml PBS auf die Plättchen gegeben. Der PBS-Puffer wurde entfernt und den Testkörpern mit Hilfe einer vereinfachten Alkoholtrocknungsreihe das noch anhaftende Wasser entzogen. Dazu wurde erst jeweils 2 ml 50% Ethanol, dann 2 ml 99% Ethanol für jeweils 5 Minuten auf die Titanplättchen gegeben. Der Alkohol wurde abgezogen und die Well-Platte zum Trocknen für 10 Minuten unter den Abzug gestellt. In der Zwischenzeit wurde der in Eppendorf-Reaktionsgefäßen eingefrorene Sybr-Green-1-Farbstoff aufgetaut und in einer Verdünnung 1:1000 mit Tris-Puffer angesetzt. Die Titanplättchen wurden für 10 Minuten mit 2 ml der Färbelösung belassen. Da der Farbstoff lichtsensibel ist, wurde die Well-Platte während dieser Zeit lichtdicht abgedeckt. Auf das Absaugen der Färbelösung folgten weitere 5 Waschdurchgänge mit 2 ml Tris-Puffer pro Plättchen, um

überschüssigen fluoreszierenden Farbstoff zu entfernen. Nach dem letzten Absaugen des Tris-Puffers wurde die Platte mit den Probenträgern erneut für 10 Minuten abgedunkelt zum Trocknen unter den Abzug gestellt. Darauf folgte die Messung im Photospektrometer SpektraFlourPlus (Firma Tecan, Crailsheim) bei 485 nm Exzitation und 535 nm Emission. Aufgrund der zu hohen Eigenfluoreszenz der Bondingproben, die eine Diskriminierung zwischen Biomasse und Hintergrund nicht zuließen, musste auf die Verwendung von Sybr-Green-1 in den Hauptversuchen verzichtet werden.

3.2.4.3 Vorversuche mit der Gram-Färbung

Streptococcus mutans ist ein grampositiver Keim. Es wurde versucht die Zahl der auf einer Probe aufgewachsenen Bakterien über Anfärbung der Bakterien mittels Gram-Färbung und folgende Auszählung unter dem Lichtmikroskop festzustellen.

Die Vorbereitung der Proben verlief zu Beginn nach demselben Schema wie mit dem Sybr-Green-1-Farbstoff. Nach den zwei Spülvorgängen mit PBS folgte das Fixieren der Bakterien auf den Proben durch das 3,7%prozentige Formaldehyd. Es folgte die Alkoholtrocknungsreihe. Danach wurde Karbol-Gentianaviolett-Lösung im Überschuss auf die Probenträger gegeben. Der Farbstoff wurde nach 2 Minuten abgewaschen und die Lugolsche Lösung aufgetragen, welche grampositive und gramnegative Bakterien dunkelblauviolett färbt. Folgend konnte der eigentlich entscheidende Schritt für die Gram-Färbung, das Entfärben durch Alkohol und Gegenfärben mit Fuchsin-Rot, weggelassen werden, da es sich bei der Bakteriensuspension um eine grampositive Monokultur handelte. Trotzdem wird im Folgenden für diesen Färbeversuch der Begriff der Gram-Färbung verwendet.

3.2.4.4 Vorversuche mit WST-1-Reagens

1983 wurde von Mosmann mit dem MTT der erste Zellfarbstoff auf Grundlage der Tetrazoliumsals in die Wissenschaft eingeführt [60]. Das WST-1-Reagens (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) stellt einen weiterentwickelten

Tetrazolfarbstoff dar, der nur mit stoffwechselaktiven Organismen eine Reaktion zeigt. Grundlage ist die Umwandlung eines Tetrazoliumsalses in Formazan durch Dehydrogenasen der Atmungskette. Heute sind Tetrazoliumsalses als Nachweismethode in Wachstumsversuchen mit eukaryonten Zellen weit verbreitet [59]. Die Umsetzung des Salzes führt durch Bildung des farbigen Formazans zu einem Farbumschlag von Magenta nach Gelb-orange. Die Absorption steht in einem linearen Verhältnis zur Anzahl vorhandener, vitaler Zellen. Durch diese Eigenschaften erfüllt das WST-1-Reagens sehr gut die an den Farbstoff gestellten Anforderungen, auf den antibakteriell beschichteten Oberflächen der Probenkörper aufgewachsene Biomasse nachzuweisen.

Es wurde eine Inkubation mit dem Zellproliferationsfarbstoff WST-1-Reagens in PBS gewählt, nachdem sich die Mischung von WST-1 mit dem Nährmedium als schlechter kontrastbildend erwiesen hatte. Nach der 22-stündigen Bebrütung des Bakterienmischungen auf den Proben wurde das Nährmedium abgesaugt. Dieses geschah vorsichtig, um den entstandenen Biofilm möglichst wenig zu reduzieren. Folgend wurden halbautomatisch mittels Eppendorf Pipettus jeweils 600 µl des 1:10 mit PBS verdünnten WST-1-Reagens in die Vertiefungen der Well-Schalen gegeben. Anschließend wurden sie für weitere 15 Minuten bei 37° C bebrütet. In Vorversuchen mit Verdünnungsreihen von 1:10, 1:100 und 1:1000 stellte sich eine Verdünnung von 1:10 als am besten geeignet heraus. Die Expositionszeit wurde zwischen 15, 30, 60 und 120 min variiert. Als optimal wurde eine wie vom Hersteller angegebene 1:10-Verdünnung in PBS mit 15 Minuten Inkubationszeit befunden. Es folgten die Entnahme des Bakterien-Farbstoff-Gemisches und die Zentrifugierung in Eppendorf Reaktionsgefäßen für 5 Minuten bei 13 000 rpm. Die Proben wurden aus der Zentrifuge entnommen und je 200 µl in Vertiefungen einer 96-Well-Platte gegeben. Auf die Position A1 wurde der Leerwert appliziert. Nach einer Spalte freier Wells folgten die von den zentrifugierten Proben abgezogenen Überstände. So konnten die Proben in Relation zur Nullreaktion gemessen werden.

Es wurde zudem untersucht, ob die Proben ohne Anwesenheit von Bakterien eine verändernde Wirkung auf den Farbstoff besitzen. Dies war nicht der Fall.

Die Werteskala der Ausgabe des Photometers lag zwischen 0 und 4. Die Werte spiegeln die Anwesenheit stoffwechselaktiver Bakterien wieder. Je höher die Werte, desto mehr Bakterien waren vorhanden.

3.2.4.5 Wachstumsversuche

In zahlreichen Vorversuchen wurden die Homogenität und die Reproduzierbarkeit der Wachstumskurven der gezüchteten *S. mutans* Kulturen optimiert.

In einem 50 ml Greiner-Röhrchen wurde eine Übernachtskultur aus Thioglykolat-Medium sowie einer *S. mutans*-Suspension hergestellt und für 24 Stunden bei 37° C inkubiert. 2,7 ml dieser Suspension wurden nachfolgend auf 37 ml frischen Mediums pipettiert und wiederum bei 37° C für 2 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurden dann schließlich die vorhergehend beschriebenen Probenkörper in den 24-Well-Schalen mit jeweils 1,5 ml beimpft und für weitere 22 Stunden bebrütet. Nach dieser Zeit wiesen die Probenkörper ohne antibakterielle Beschichtung eine sehr ausgeprägte Biofilmbildung auf. Das Procedere wurde mit verschiedenen Bakterienstämmen (*Staph. epidermidis*, *S. sanguinis*, *S. mutans*) durchgeführt. Die Staphylokokken wurden aerob bebrütet und währenddessen leicht bewegt. Die Streptokokken erforderten eine anaerobe Anzucht. Als Kulturmedium kamen Schädler- und Thioglykolat-Medium zum Einsatz. Auch die Wachstumszeiten wurden zwischen 24 und 48 Stunden variiert und danach die Menge der aufgewachsenen Biomasse untersucht. Dabei erwies sich eine 24-Stunden-Kultur für *S. mutans* als am besten geeignet.

Als besonders gut geeigneter Kulturablauf stellte sich eine 24-stündige Vorkultur, die Umsetzung in eine weitere 2-stündige Vorkultur mit folgender Beimpfung der Probenkörper und Bebrütung für weitere 22 Stunden heraus.

3.2.4.6 Verschiedene Parameter

Es wurden verschiedene Schemata getestet, um eine möglichst gleichmäßige Beschichtung der Probenkörper zu gewährleisten. Das Bondinggemisch wurde im Gitter-, Linienschema und zufällig ungeordnet, ohne Schema, aufgebracht.

Weiter wurde untersucht, ob sich ein Pinselwechsel nach jedem Plättchen auswirkt. Eine möglichst gleichmäßige Schichtstärke des Adhäsiv-/Taurolidingemisches wurde mit einem gitterförmigen Aufbringenschema, mit Pinselwechsel nach jedem Probenträger realisiert.

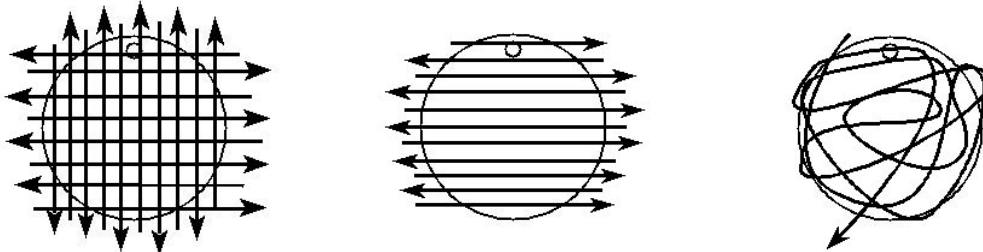


Abb. 8: Untersuchte Beschickungsschemata. - Gitter, Linien und ungeordnete Aufbringung

Um eine gleichmäßige Beschichtung der Probenträger zu erreichen, wurde für jeden Anmischvorgang jeweils die gleiche Menge Adhäsiv abgewogen. Diese Portion wurde mit dem errechneten Anteil des Wirkstoffes vermengt. So ergab sich eine gleichbleibende Menge des Wirkstoffgemisches, welches in 8 Portionen aufgeteilt und auf die Proben aufgetragen wurde.

Mit den bewachsenen Probenträgern wurden Versuche unternommen, unter welchen Bedingungen die aufgewachsenen Bakterien am besten auf dem Plättchen erhalten werden konnten. Hierzu wurde das Medium abgesaugt die Plättchen bzw. das Polystyrol folgend nicht, einmal oder zweimal mit PBS abgespült. Dabei stellte sich als optimal heraus, nur die frei schwimmenden Bakterien abzusaugen und auf eine weitere Spülung zu verzichten.

3.2.5 Versuche

3.2.5.1 Vorkultur

Für die erste Vorkultur wurden 10 µl der aufgetauten Glycerinkultur pro 2 ml Thioglykolatmedium unter einer Sterilbank in ein steriles 15-ml-Greiner-Röhrchen aus Kunststoff gegeben, welches mit einem dichten Verschluss versehen war. Anschließend wurde diese Vorkultur für 24 Stunden in einen 37° C warmen Brutschrank gestellt. Nach 24 Stunden wurden 2,7 ml dieser Suspension ebenfalls unter der Sterilbank entnommen und in einer autoklavierten 100-ml-

Schraubverschlussflasche auf 37 ml frischen Mediums gegeben. Diese zweite Kultur wurde für weitere 2 Stunden im 37° C-Brutschrank gestellt.

3.2.5.2 Beimpfen der Plättchen

Die vorbereiteten Probenräger wurden, in der 24 Well-Schale liegend, unter der Sterilbank mit jeweils 1,5 ml der angesetzten Bakteriensuspension beschichtet. Darauf folgte eine weitere Bebrütung bei 37° C für weitere 22 Stunden.

3.2.5.3 Der WST-Test

Zur Herstellung der Farbstofflösung wurden gemäß Herstellerangaben 1,5 ml des aufgetauten WST-Farbstoff-Konzentrates mit 13,5 ml sterilen PBS unter der Sterilbank vermischt.

Nach der Bebrütungszeit wurde das Medium mit einer Vakuumpumpe abgesaugt, wobei der Sog so angepasst wurde, dass der Biofilm aufgewachsener Bakterien nicht geschädigt wurde. Folgend wurden, um ein Austrocknen der Bakterien zu verhindern, direkt 600 µl des Farbstoffgemisches auf die Plättchen gegeben. Die so beschickte Platte wurde wiederum bei 37° C für 15 Minuten inkubiert. Nach abgelaufener Zeit wurde die Flüssigkeit mit einer Pipette abgesaugt und jeweils in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Diese wurden darauf bei 13 000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, um sämtliche Bakterien zu entfernen und eine fortschreitende Umsetzung des Farbstoffes zu verhindern. Der Überstand wurde daraufhin photometrisch ausgewertet.

3.2.6 Auswertung

3.2.6.1 Rohdatenerfassung

Die Messung erfolgte mittels Photometer SpektraFluorPlus, mit dem für den Test angegebenen Filtersatz (Exzitation 465 nm, Emission 635 nm). Die Auswertung der gemessenen Werte erfolgte mit der Software Magellan 3

(Gauss, Hamburg), welche eine Leerwertkorrektur durchführte, bei der die Rohdaten vom Leerwert bereinigt werden.

Das Photometer SpectraFluorPlus wurde mit dem Exzitations- und Emissionsfilter ideal auf den verwendeten Farbstoff Formazan eingestellt. Die Konfiguration wurde so gewählt, dass jede Probe mit zwei Lichtblitzen gemessen und daraus der Mittelwert errechnet wurde. Die Ausgabe der Messungen lag zwischen 0 und 4. Als willkürliche Einheit wurde hier die Relative Absorption Unit (RAU) verwendet. Je höher der Wert liegt, desto mehr stoffwechselaktive Mikroorganismen waren auf der Probe vorhanden.

Als negative Wachstumskontrolle wurde bei jeder Versuchsreihe Polystyrol (PS) verwendet. Sie diente dazu, eine Aussage sowohl über die Biofilmhomogenität, als auch über ein nicht beeinträchtigt Wachstum der Bakterien zu erhalten.

3.2.6.2 Statistik

Zur Auswertung der Daten wurde der Kuskal-Wallis-Test für unabhängige Proben herangezogen. Das Signifikanzniveau (p) wurde auf $p=0,05$ festgelegt. Um eine Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen zu verhindern, wurden die Testergebnisse nachfolgend der Alpha-Adjustierung nach Bonferroni unterzogen.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Vorversuche

4.1.1 Ergebnisse des Agardiffusionstests

Die im Versuch entstandenen Hemmhöfe zeigten, dass bei den Wirkstoffgemischen eine konzentrationsabhängige Bakterizidie vorlag. Das mit der stärksten Konzentration (1/2 Taurolidin/OptiBond FL) beschichtete Titanplättchen hatte einen Hemmhof von 43 mm an seiner größten Ausdehnung. Die 1/4-Verdünnung erbrachte noch einen Hemmhof von 37 mm Durchmesser. Das nur mit Bonding beschichtete Plättchen zeigte keinerlei Hemmung des bakteriellen Wachstums. Daraus wurde, in Kongruenz mit den in der Literatur gefundenen Fakten der Schluss gezogen, dass polymerisiertes Bonding keine toxische Wirkung mehr besitzt. Zudem wurde geschlossen, dass die Abgabekinetik aus dem Gemisch konzentrationsabhängig ist: Je höher der Anteil an Taurolidin, desto mehr antibakterieller Stoff diffundiert heraus.

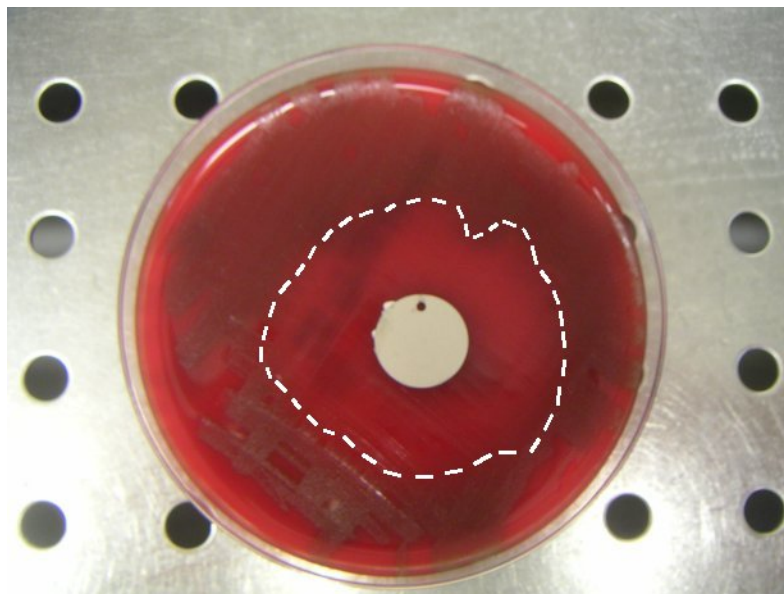


Abb. 9: Agardiffusionstest. - Der Probenträger ist mit einer Verdünnung von Taurolidin/OptiBond FL = $\frac{1}{2}$ beschichtet - der Hemmhof beträgt 43 mm im Durchmesser an seiner größten Ausdehnung (gestrichelte Linie).

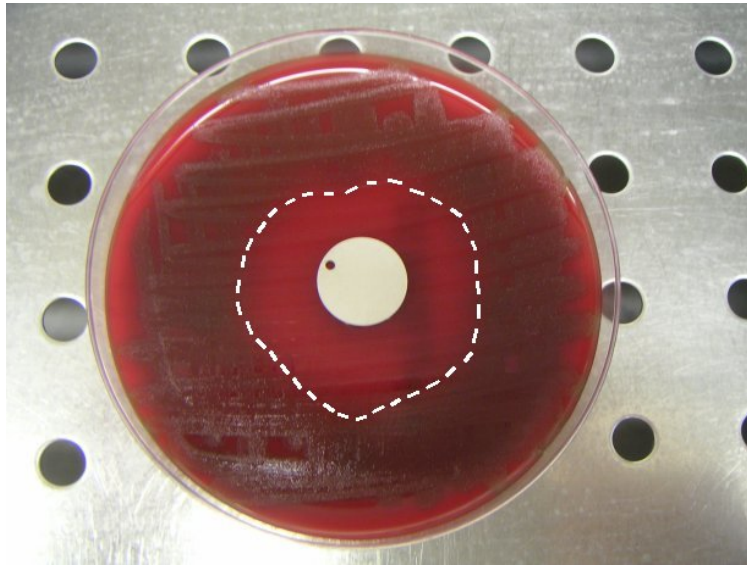


Abb. 10: Agardiffusionstest. - Der Proben­träger ist mit einer Verdünnung von Taurolidin/OptiBond FL = $\frac{1}{4}$ beschichtet - der Hemmhof beträgt 37 mm an seiner größten Ausdehnung.

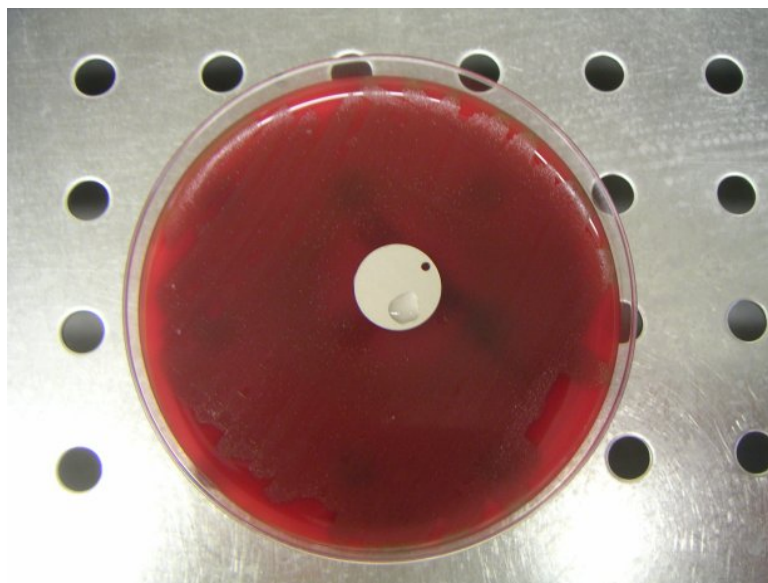


Abb. 11: Agardiffusionstest. - Der Proben­träger ist nur mit OptiBond FL beschichtet - es ist kein Hemmhof erkennbar.

4.1.2 Ergebnisse mit dem DNA-Farbstoff Sybr-Green-1

Die Versuche mit dem DNA Fluoreszenzfarbstoff Sybr-Green-1 ergaben kein verwendbares Ergebnis. Die Eigenfluoreszenz der Kunststoffschicht war bereits

so hoch, dass die mit Sybr-Green-1 angefärbte Bakterien-DNA in ihrer Intensität vom Hintergrundrauschen überlagert wurde. Bei der optischen Begutachtung unter dem Lichtmikroskop bei gleicher Wellenlänge wie im Spektrometer waren keine Bakterien vom Hintergrund zu unterscheiden. Die Verwendung der Ergebnisse des Photometers hätte vor allem die Fluoreszenzintensität des Kunststoffes, nicht jedoch die Menge der Bakterien wiedergegeben.

4.1.3 Ergebnisse der Gramfärbung

Der Versuch, die auf den Probenträgern aufgewachsenen Bakterien durch eine Gramfärbung sichtbar zu machen und unter dem Lichtmikroskop auszuzählen, erbrachte ebenfalls keinen Erfolg. Durch Kapillarkräfte wurde der Farbstoff unter die Beschichtung gezogen, sodass wiederum keine Bakterien vom Hintergrund zu unterscheiden waren.

4.2 Ergebnisse der Hauptversuche

Da für jede der vier Versuchsreihen eine neue Bakterienkultur angesetzt wurde, können die Ergebnisse der einzelnen Testreihen relativ, nicht jedoch absolut miteinander verglichen werden. Für jede Vorkultur wurde eine stochastisch unterschiedliche Menge an Keimen aus der Glycerinsuspension entnommen. Die Durchläufe absolut miteinander zu vergleichen würde einen statistischen Fehler bedeuten.

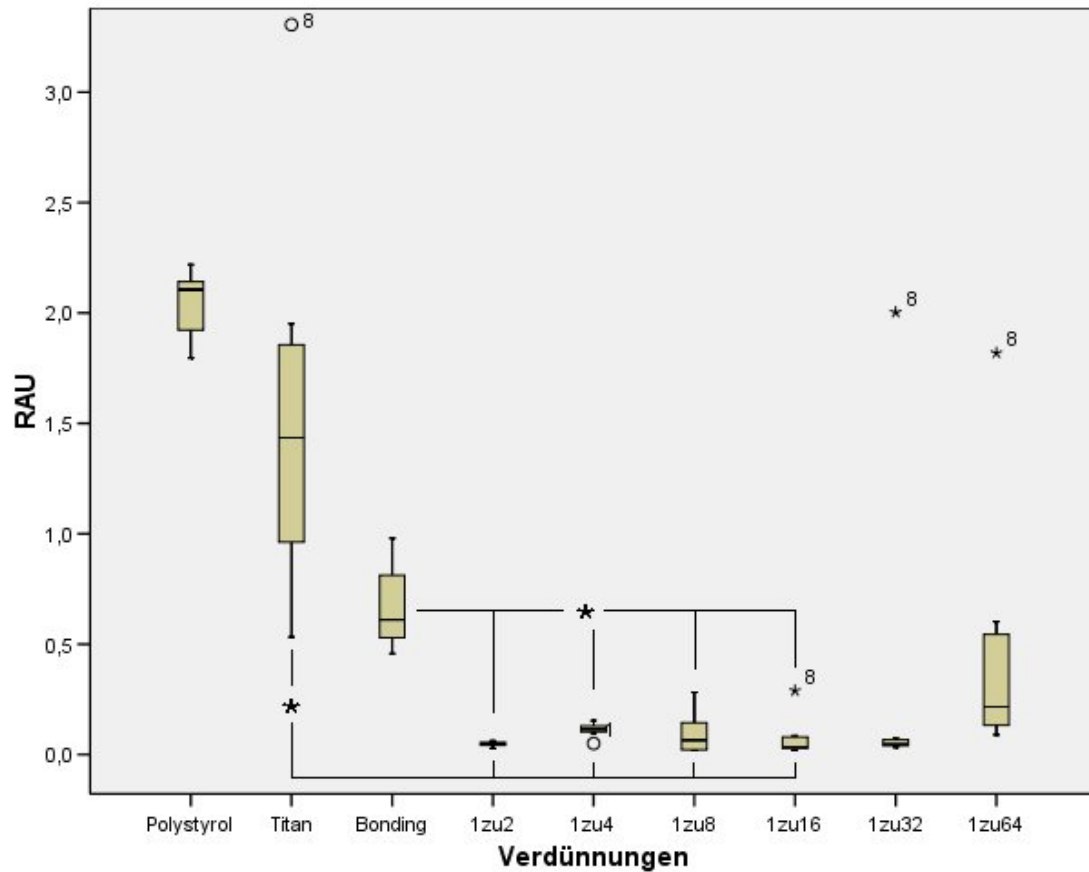
Die Abbildungen 12 bis 17 zeigen die durch den Farbumschlag nachgewiesene Biomasse auf den Probenkörpern; entstanden nach 22 stündigem Bewuchs im Brutschrank bei 37°C. Jeweils zwei Graphiken stellen einen Versuchsdurchlauf dar, wobei der zweite Boxplot einige Werte aus dem vorhergehenden vergrößert.

Abb. 18 und 19 stellen eine 4. Versuchsreihe dar, in welcher nur Polystyrol (PS), Bonding und Taurolidin/Bondinggemisch im Verhältnis 1:2 getestet wurden. Die Signifikanzniveaus sind unter den Schaubildern angegeben. P beträgt für die ersten drei Versuchsreihen adjustiert 0,00384. Die mit

* gekennzeichneten p sind die jeweils errechneten spezifischen Vergleichsniveaus.

Der Bewuchs der Titanplättchen lag durchschnittlich um ca. 30 Prozent unter dem Wert des Polystyrols. Die Titanplättchen simulieren die Probenträger ohne jede Beschichtung und werden deshalb nachfolgend als Vergleichswert herangezogen. In allen Versuchsreihen war schon mit bloßem Auge ein Unterschied in der Trübung des Nährmediums zu erkennen: Über den mit Wirkstoffgemisch oder Bonding beschichteten Proben war eine geringere Trübung des Nährmediums feststellbar als über PS oder Titan.

4.2.1 Ergebnisse der 1. Versuchsreihe



$p < 0,00384$

* $p = 0,0001554$

Abb. 12: Darstellung der Versuchsergebnisse der 1. Versuchsreihe. - Es ergibt sich eine Reduktion der Bakterien auf den beschichteten Probenkörpern im Vergleich zum Titan um 96,7% für die 1zu2, um 91,9% bei der 1zu4 Verdünnung und um 97,6% bei der 1zu16 Verdünnung.

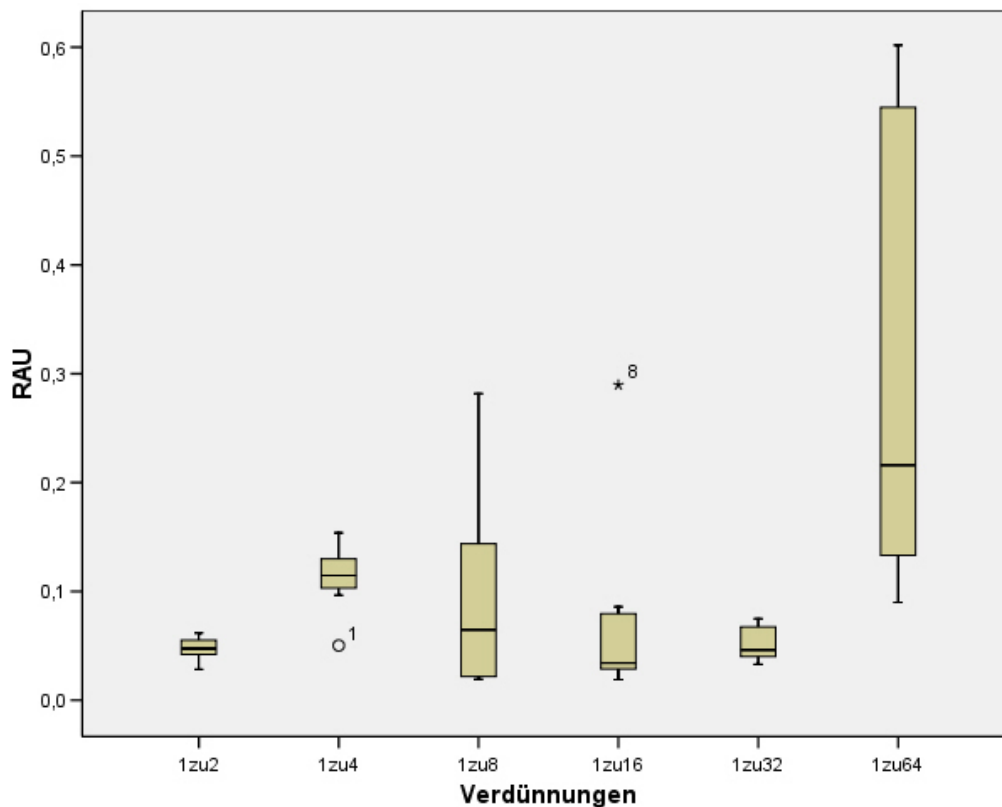
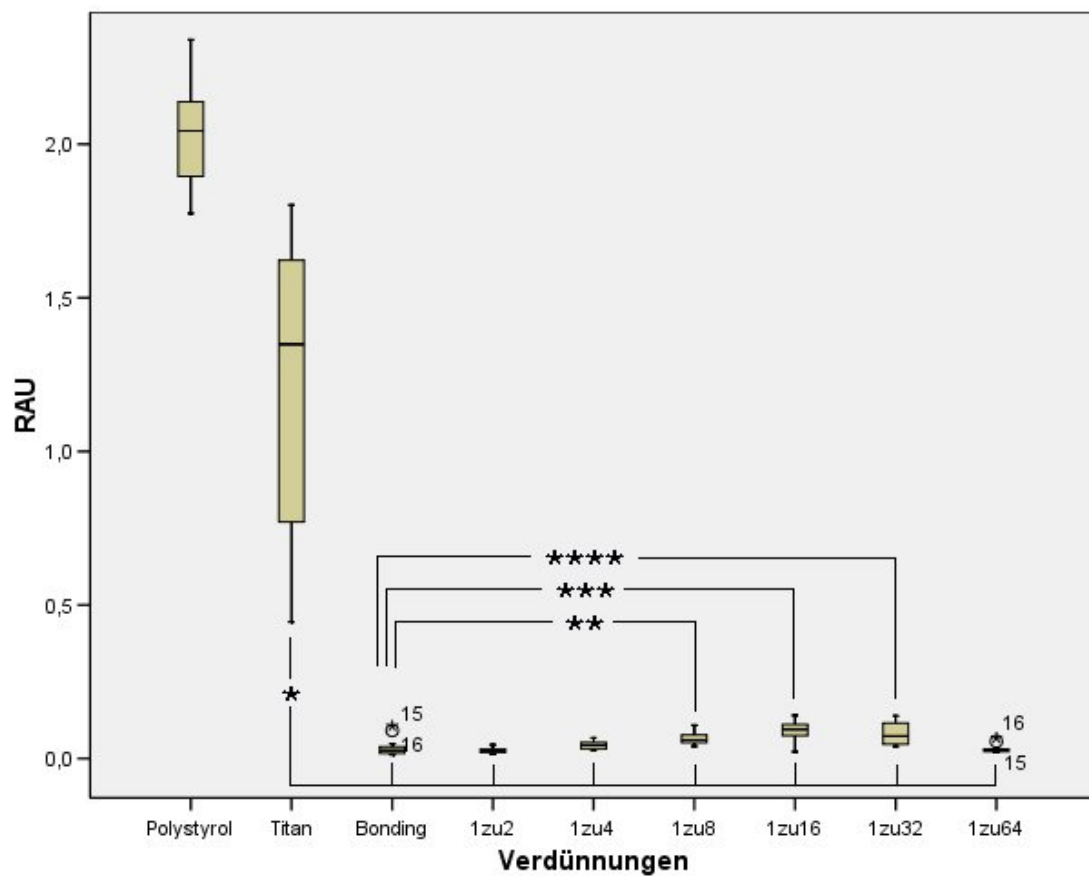


Abb. 13: Vergrößerung der Werte aus Abb. 12.

Setzt man die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe in Relation, so ergibt sich für die 1zu2 Verdünnung eine Reduktion der Keimzahl zum reinen Titanprobenkörper von 96,7%. Durch die Alphaadjustierung war der Unterschied von Titan zu Bonding dieser Versuchsreihe nicht signifikant verschieden. Die 1zu4 Verdünnung hatte einen um 91,9% geringeren Bewuchs und die 1zu16 Verdünnung ebenfalls noch um 97,6% im Vergleich zur Titanoberfläche. Im Vergleich zum bereits bakteriziden Bonding ergibt sich für die Taurolidinverdünnungen eine weitere signifikante Reduktion um 92,2% für das 1zu2 Gemisch. Die 1zu4 Suspension reduziert die Keime noch um 81,2%, und für die letzte signifikant unterschiedliche Wirkstoffverdünnung von 1zu16 besteht eine Reduktion um 94,4%% gegenüber den RAU-Werten beim Bonding.

4.2.2 Ergebnisse der 2. Versuchsreihe



$p < 0,00384$

**** $p = 0,0000707$

* $p = 0,00000000333$

** $p = 0,000106$

*** $p = 0,000129$

Abb. 14: Darstellung der Versuchsergebnisse der 2. Versuchsreihe. - Es ergibt sich eine Reduktion der Bakterien auf den beschichteten Probenkörpern im Vergleich zum Titan um 98% für das Bonding ebenso wie für die 1zu2 Verdünnung und um 96,8% für die 1zu4 Verdünnung.

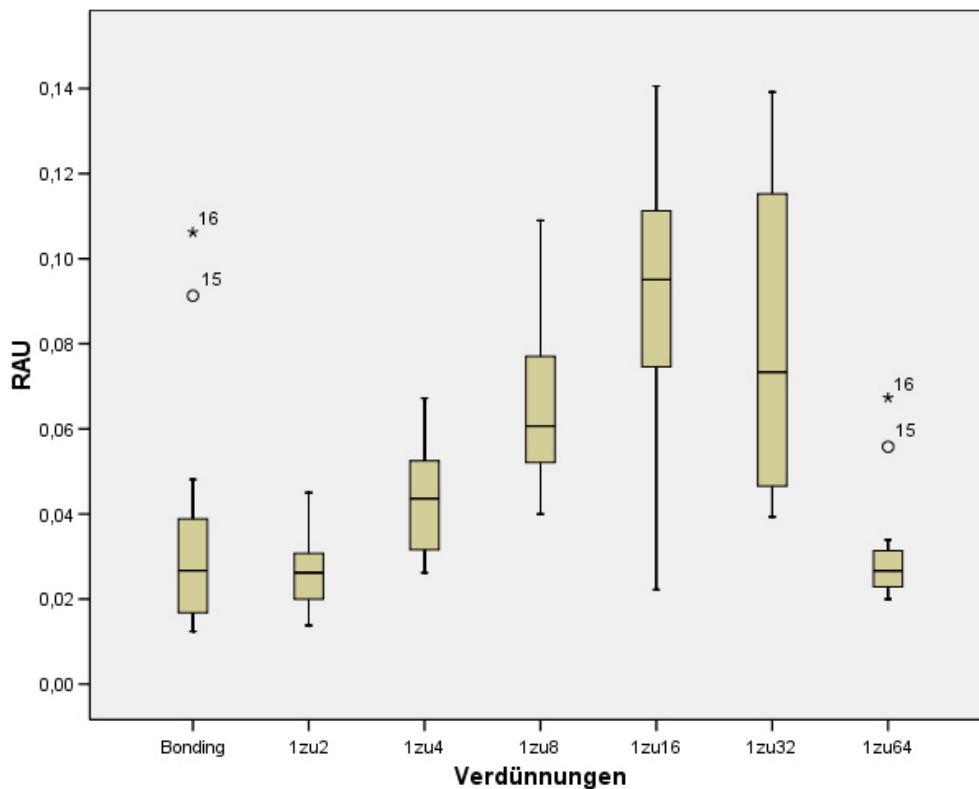
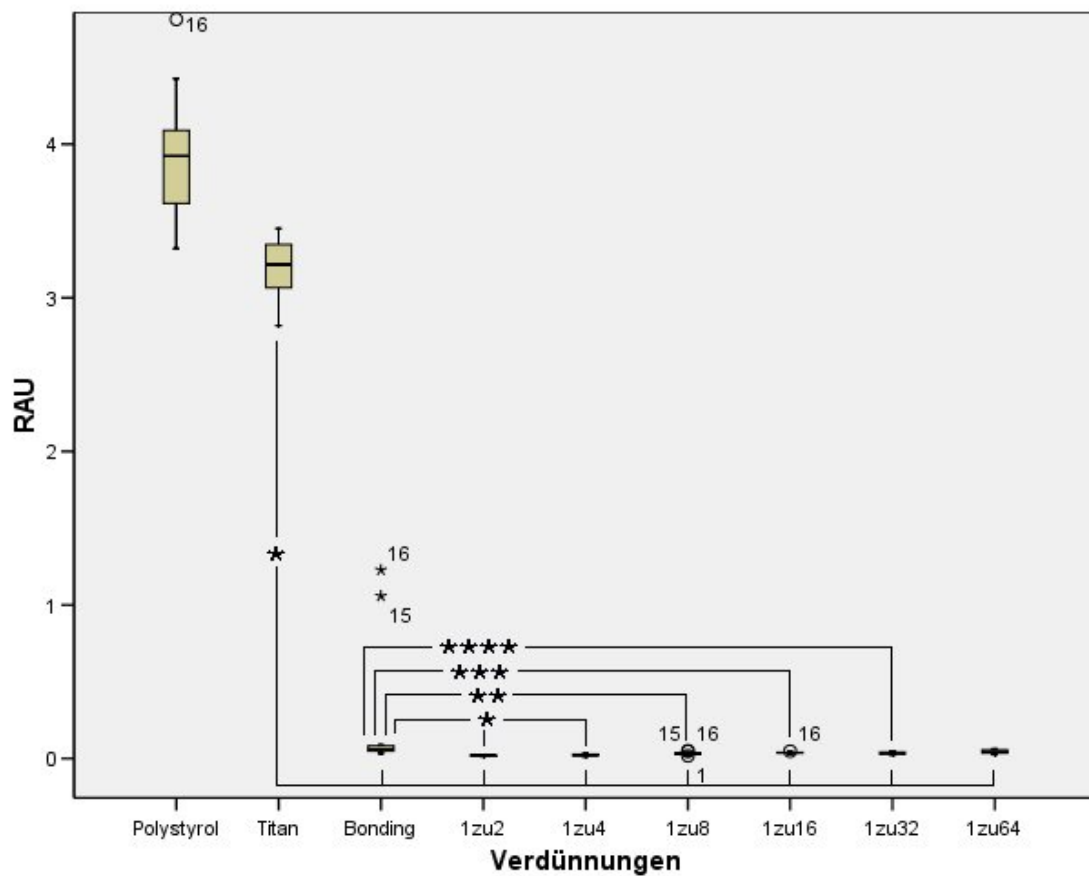


Abb. 15: Vergrößerung der Werte aus Abb. 14.

In diesem Versuchsdurchlauf reduzierten das Bonding und die 1zu2 Wirkstoffverdünnung die Bakterienzahlen auf den Probenkörpern um 98% gegenüber dem Titanplättchen. Folgend nahmen die Werte erwartungsgemäß zu. Die 1zu4 Verdünnung ergab eine Keimreduktion um 96,8% welche für die 1zu16 Verdünnung auf 93% abnahm. Die Ergebnisse der 1zu32 und 1zu64 Verdünnungen ergaben, anders als erwartet, niedrige Werte im Bereich der 1zu2 bzw. 1zu4 Verdünnungen von 94,6% bzw. 98% weniger Keimen auf den Proben.

In dieser Versuchsreihe befanden sich so wenige Keime auf der Bondingprobe, dass es in der Wirkung die Taurolidinverdünnungen noch übertraf. Signifikante Unterschiede waren nur zwischen 1zu8 bis 1zu32 und dem Bonding feststellbar. Die Werte lagen um durchgehend über 200% über dem Wert des reinen OptiBond FL. Ohne den Ausreißer der 1zu64 Verdünnung ist die Progredienz der Zellzahlen mit abnehmender Wirkstoffkonzentration gut zu erkennen.

4.2.3 Ergebnisse der 3. Versuchsreihe



$p < 0,00384$
 $***p = 0,000013$

$*p = 0,0000000333$
 $****p = 0,00000894$

$**p = 0,00000304$

Abb. 16: Darstellung der Versuchsergebnisse der 3. Versuchsreihe. - Es ergibt sich eine Reduktion der Bakterien auf den beschichteten Proben im Vergleich zum Titan um 98,3%. Die Oberfläche der 1zu2 und der 1zu4 Verdünnung lagen bei einer Verringerung um 99,3%.

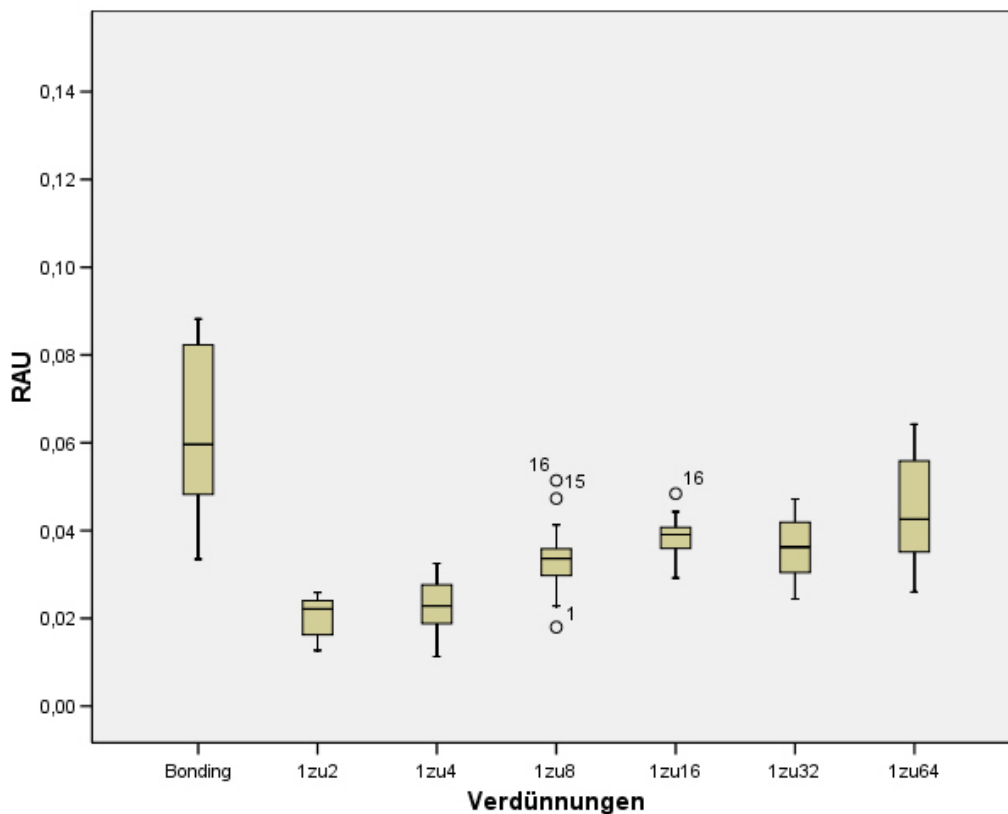


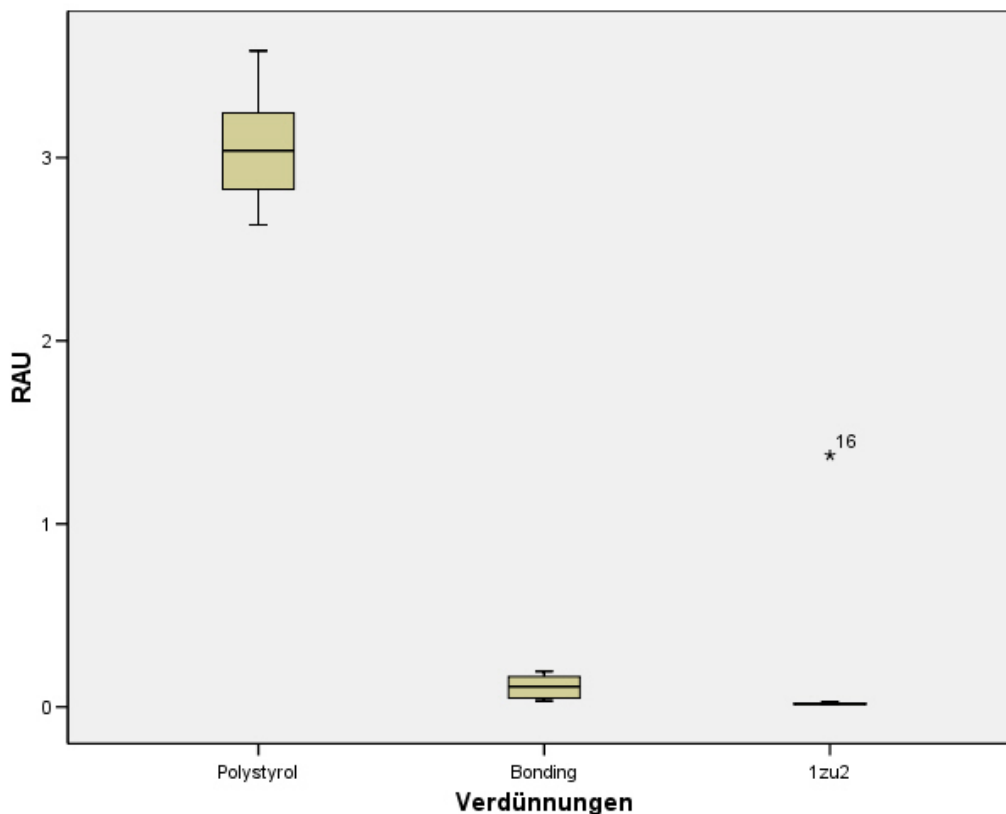
Abb. 17: Vergrößerung der Werte aus Abb. 16.

In der 3. Testung reduzierte das Bonding die Zellzahlen auf der Oberfläche im Vergleich zum Titan um 98,3%. Die Verdünnungen 1 zu 2 und 1 zu 4 waren in diesem Vergleich nur unwesentlich besser. Sie lagen bei einer Reduktion um 99,3%. Vergleicht man das Bonding jedoch direkt mit den Verdünnungen, zeigt sich eine Reduktion der vitalen Organismen um weitere 60% bzw. 59%. In diesem Versuchsdurchlauf zeigte die Wirkstoff suspension eine signifikant höhere Bakterizidie als der Bonding kunststoff alleine. Die Werte steigen, wie es bei den Testreihen erwartet wurde mit der Verdünnung des Wirkstoffes kontinuierlich an. Die Zellzahl auf den Proben nimmt mit Abnahme des Wirkstoffes immer mehr zu. Reduziert die 1zu2 Verdünnung die Bakterien im Vergleich zum mit Bonding beschichteten Probenträger um 60%, so fällt die Bakterizidie im Vergleich kontinuierlich ab. Bei der Verdünnung von 1 zu 32 liegt nur noch eine Reduktion der Bakterien um 34% im Vergleich zum OptiBond FL vor.

Tab. 4: Tabellarische Darstellung der prozentualen Keimreduktion auf der Oberfläche der Probenträger. Die erste Zeile beinhaltet die Ergebniswerte des WST-Testes. In der zweiten Zeile wird Titan als Vergleichswert (100%) festgesetzt, in der dritten Zeile das Bonding.

Bemerkung	Titan	Bonding	1zu2	1zu4	1zu8	1zu16	1zu32	1zu64
1. Versuchsreihe								
WST Werte	1,4149	0,6107	0,0476	0,1147	0,0648	0,0343	0,0412	0,2159
	100,00%	43,16%	3,36%	8,11%	4,58%	2,42%	2,91%	15,25%
		100,00%	7,79%	18,78%	10,61%	5,61%	6,74%	35,35%
2. Versuchsreihe								
WST Werte	1,3483	0,0267	0,0262	0,0436	0,0607	0,0951	0,0734	0,0267
	100,00%	1,98%	1,94%	3,23%	4,50%	7,05%	5,44%	1,98%
		100,00%	98,12%	163,29%	227,34%	356,17%	274,91%	100,00%
3. Versuchsreihe								
WST Werte	3,2161	0,0553	0,0222	0,0228	0,0337	0,0391	0,0363	0,0426
	100,00%	1,71%	0,69%	0,71%	1,05%	1,22%	1,13%	1,32%
		100,00%	40,14%	41,22%	60,94%	70,71%	65,64%	77,00%

4.2.4 Ergebnisse der 4. Versuchsreihe



$p < 0,05$

$p = 0,00000292$

Abb. 18: Darstellung der Versuchsergebnisse der 4. Versuchsreihe. - Das Bonding reduzierte die Keime um 96,3%, die 1zu2 Verdünnung um 99,4%.

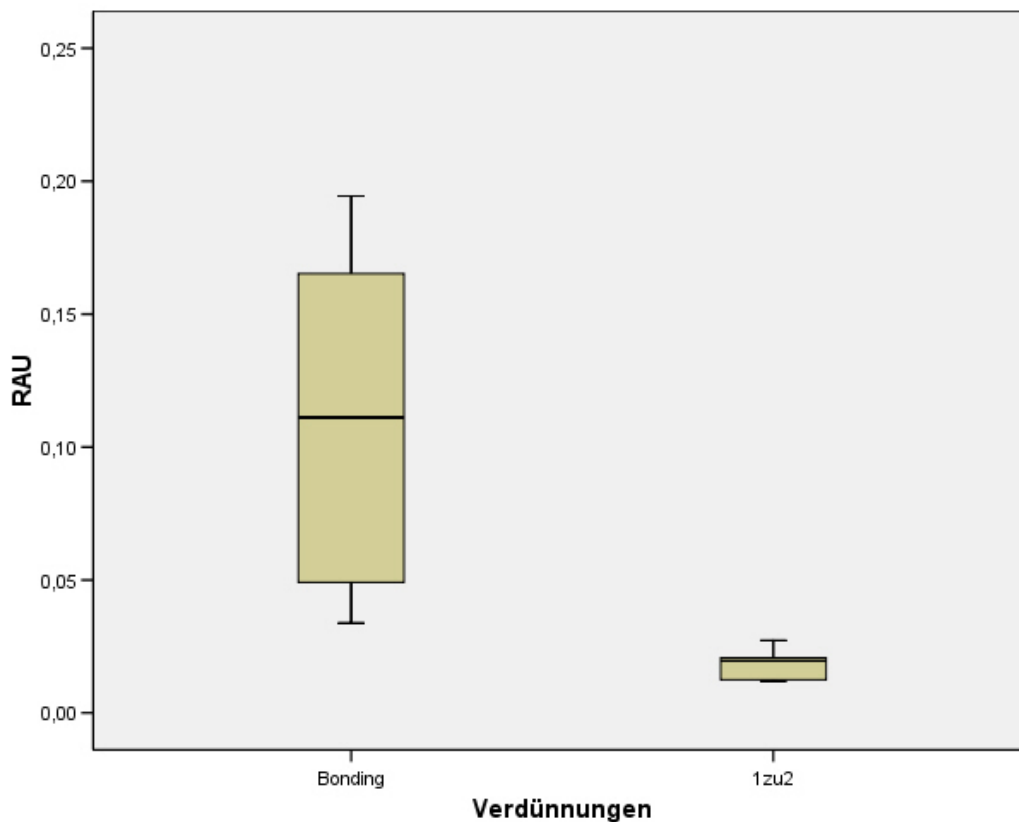


Abb. 19: Vergrößerung der Werte aus Abb. 18.

Tab. 5: Tabellarische Darstellung der prozentualen Keimreduktion auf der Oberfläche der Proben. Die erste Zeile beinhaltet die Ergebniswerte des WST-Testes. In der zweiten Zeile wird Titan als Vergleichswert (100%) festgesetzt, in der dritten Zeile das Bonding.

Bemerkung	PS	Bonding	1zu2
WST Test Ergebnisse	3,0376	0,1112	0,0197
	100,00%	3,66%	0,64%
		100,00%	17,72%

Die 4. Versuchsreihe verifiziert die Daten der Bakterizidie des Bondings und der Verdünnungen zueinander und im Gegensatz zum Polystyrol. Auf dem Bonding sind im Vergleich zum PS 96,3% weniger Bakterien vital. Auf der Wirkstoff suspension ist diese Zahl noch geringer. Die 1zu2 Taurolidin-Bonding-Mischung reduzierte die Bakterien auf der Oberfläche um 99,4%. Daraus ergibt

sich für den Vergleich von Bonding zur 1zu2 Suspension eine Reduktion der vitalen Organismen auf dem Taurolidin um weitere 82,3%.

4.3 Statistik

Die statistische Analyse der Daten zeigte einen signifikanten Unterschied im Bewuchs zwischen der unbehandelten Titanoberfläche und der Wirkstoffkombination. Ebenfalls ergab sich eine Signifikanz zwischen der Titanoberfläche und dem mit Bonding beschichteten Probenkörper. Die bei der Anzahl der untersuchten Probenkörper verfügbare Teststärke war nicht ausreichend zur Klärung der Frage, ob Bonding und Taurolidin-Suspension in ihrer antibakteriellen Wirkung gleichwertig oder unterschiedlich sind.

5 Diskussion

5.1 Material

5.1.1 Titan als Versuchsoberfläche

In *in vitro* Studien an Biofilmen kommen neben Titan oder chirurgischem Stahl [48] häufig auch Hydroxylapatit oder Glasoberflächen zum Einsatz [49, 50]. Hydroxylapatit weist jedoch eine Eigenfluoreszenz auf, welche die zu Beginn geplante Auswertung mittels DNA-Fluoreszenzfarbstoff Sybr-Green-1 nicht zugelassen hätte. Eine Befestigung des Kunststoffes auf der Glasoberfläche hätte sich als technisch schwierig dargestellt. In anderen Arbeiten der Forschungsgruppe der FMZ hat sich Titan als Oberflächenmodell für Biofilmexperimente etabliert.

Als Legierung oder Reinmetall wird Titan heute in vielen Bereichen der Medizin eingesetzt, da es eine herausragende Biokompatibilität aufweist [51, 52, 53]. Diese hohe Biokompatibilität ist heute allgemein anerkannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde Titan Grade 2 als größtenteils unpolierte, nicht speziell vorbehandelte Plättchen verwendet [58]. Die Oberfläche sollte in erster Linie dem Bondinggemisch einen ausreichenden Halt bieten.

5.2 Methode

5.2.1 Biofilmmodell

Streptococcus mutans spielt die herausragende Rolle in der Ätiologie der Karies. Dieser Stamm gehört innerhalb der Gattung der Streptokokken den oralen- oder viridans-Streptokokken an. Wegen seiner großen pathologischen Bedeutung und der Fähigkeit, sich durch die extrazelluläre Matrix fest an einer Oberfläche anzuhafte, wurde in der vorliegenden Versuchsreihe als Modellkeim *Streptococcus mutans* ausgewählt.

In der Literatur werden häufig komplexe, polymikrobielle Biofilmmodelle für *in vitro* Versuche gefordert [55, 56]. Sicherlich ist es richtig, dass ein solches polymikrobielles Biofilmmodell die *in vivo* Situation mit all ihren Einflüssen

genauer nachbilden kann. In der vorliegenden Arbeit soll jedoch vorerst die grundlegende Frage der Wirksamkeit geklärt werden. Deshalb wurde bewusst ein einfaches, leicht reproduzierbares und ohne allzu großen Aufwand wiederholbares monomikrobielles Modell gewählt. Dabei handelt es sich nach nur 24 Stunden Bewuchszeit um einen noch sehr jungen Biofilm, welcher aufgrund seiner relativ hohen Homogenität reproduzierbar auszuwerten war.

5.2.2 Versuchsaufbau

Trotz sorgfältigster Arbeitsweise kann bei der Entnahme aus der Glycerinkultur und späteren Anzucht eine Schwankung der Zellzahlen nicht vermieden werden. Dadurch sind die in den Versuchsreihen gemessenen Werte der Biofilmmasse nur innerhalb der Versuchsreihe vergleichbar, die Reihen untereinander nur relativ quantitativ. Nichtsdestotrotz kann aus den Versuchsreihen im Vergleich eine Tendenz abgelesen werden. Ähnliche Ergebnisse in den verschiedenen Versuchen erlauben eine Aussage über die Reaktionen im Versuchsaufbau. Die Normierung der Versuchsergebnisse in jeder Versuchsreihe auf Titan und der Vergleich in Prozent erlaubten einen direkten Vergleich der Versuchsreihen untereinander.

Eine Standardisierung des Versuchsaufbaus konnte nicht zu 100% gewährleistet werden, da die Mischung der Testsuspension und die Beschichtung der Probenträger nicht durch eine Roboterkonstruktion erfolgte. Im Rahmen der Vorversuche wurden jedoch mehr als 250 Plättchen manuell beschichtet, sodass von einem ausreichend standardisierten Vorgehen ausgegangen werden kann.

5.2.3 Auswertung

Das Photometer SpectraFluorPlus ermöglichte eine Auswertung des Farbumschlages im WST-1-Reagensgemisch; somit konnten die Versuchsergebnisse graphisch dargestellt werden. Allerdings lässt sich aus den erhaltenen Werten nur eine relative Menge vorhandener Bakterien ableiten, da die erfassten Ergebnisse in Relation zu den Kontrollwerten gesetzt werden. Hieraus resultierte die willkürliche Einheit RAU (Relative Absorption Unit) für die

spezifische Absorptionswellenlänge, welche in den Versuchsreihen die vorhandene Menge an lebenden Bakterien auf den Probenträgern beschreibt.

Vor jeder Messung einer Versuchsreihe erfolgte eine automatische Kalibrierung des Spektrometers, sodass hierdurch die Ergebnisse der einzelnen Testreihen in RAU relativ miteinander verglichen werden können. Die Voraussetzung hierfür ist, dass die Wachstumskontrollen beider Reihen ein ähnliches Niveau erreichen.

Eine nachträgliche Betrachtung der Probenträger und angefärbter Bakterien unter dem Mikroskop war wegen der oben beschriebenen technischen Schwierigkeiten nicht möglich. So konnten etwaige Fehlerquellen nicht optisch ausgeschlossen werden. Als Fehlerquelle kommen beim Absaugen des Nährmediums unter den Plättchen verbliebene intakte Bakterien und Verunreinigungen der Plättchen vor dem Einlegen in die Bakteriensuspension in Frage. Die Verteilung oder Gleichmäßigkeit des Biofilms spielte keine Rolle in der Ergebnisfindung, da die gesamte Menge der vorhandenen Bakterien von der Farbstoffsuspension bedeckt wurde.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Vorversuche

5.3.1.1 Sybr-Green-1

Sybr-Green-1 ist ein hoch sensitiver DNA-Fluoreszenzfarbstoff, welcher zur Gruppe der Totfarbstoffe gehört. Für die Auswertung ist keinerlei lebender Organismus mehr vonnöten oder erwünscht. Die erste Wahl fiel auf diesen Farbstoff, da er zum einen schon geringe Mengen DNA sicher anfärbt und auswertbar macht [46] sowie zum anderen eine einfache Handhabung bietet. Er stellt eine leicht verwendbare und für den Anwender sichere Alternative zum heute in vielen Laboren noch verwendeten Ethydiumbromid dar [54]. Außerdem passte er mit seinem Exzitationsmaximum von 479 nm und dem Emissionsmaximum von 520 nm gut zu den bereits vorhandenen Filtern des Photometers SpectraFluorPlus, welche ihre Maxima bei 485 nm und 535 nm haben. Nachteilig ist eine lange Probenvorbereitung und in dem hier

vorliegenden Fall eine mögliche chemische Reaktion des Kunststoffes mit dem Alkohol während der Vorbereitungsphase. Außerdem unterscheidet Sybr-Green-1 nicht zwischen der DNA noch vitaler und/oder toter Zellen. Beide werden gleich und damit in nicht mehr unterscheidbarer Weise angefärbt. Die Eigenfluoreszenz des Komposits wurde unterschätzt, was zu verfälschten Ergebnissen führte. Die Fluoreszenz des Farbstoffes reichte nicht aus, um das Hintergrundrauschen so effektiv zu überdecken, dass signifikante Ergebnisse entstanden wären.

5.3.1.2 WST-1-Reagens

Ebenso wie Sybr-Green-1 stellt das WST-1-Reagens eine ungefährliche, alternative Nachweismethode von Zellen zum Ethydiumbromid dar. Ist es beim Sybr-Green I noch notwendig die Zellen durch Formaldehyd abzutöten und zu konservieren, kann mit dem WST-1-Reagens der Nachweis direkt an der vitalen Kultur durchgeführt werden. Potentiell gesundheitsschädliche Arbeitsschritte, etwa die Inhalation der Dämpfe bei der Fixierung oder der Kontakt des DNA-Farbstoffes mit der Haut, werden vermieden. Der eigentliche Farbstoff, das Tetrazoliumsalz, wird von mitochondriellen Dehydrogenasen umgesetzt und ist somit in hohem Maße biokompatibel.

Seit über 20 Jahren werden Tetrazoliumsalze zur Nachweisführung in Laboratorien auf der ganzen Welt eingesetzt [60]. Der Einsatz der auf Tetrazoliumsalzen beruhenden Nachweismethoden stellt heute ein Routineverfahren zum Nachweis gewachsener Zellen in Wachstumsversuchen dar.

5.3.1.3 Vorversuche

Die Vorversuche dienten vor allem der Methodikentwicklung wie auch der Weiterentwicklung des bereits vorhandenen Biofilmmodels. Die Unmöglichkeit der Auswertung der Proben über die Fluoreszenz machte eine direkte optische Auswertung unter dem Mikroskop sowie unter dem Photometer SpectraFluorPlus unmöglich. Mit dem WST-1-Reagens als Nachweismethode konnte die Zellzahl nicht so spezifisch untersucht werden. Andererseits wurden mit dieser Methode spezifisch nur die noch vitalen Organismen nachgewiesen.

Durch die Bakterizidie eliminierte Mikroorganismen, welche mit in den Färbungsprozess hineingeraten, haben also keinen Einfluss mehr auf das Ergebnis. Im Gegensatz dazu wurden mit der Sybr-Green-1-Färbemethode vorhandene, nicht vitale Bakterienzellen mitgemessen.

Die Erfolge der Vorversuche waren vor allem die Erstellung eines exakten Inkubationsplanes und die Auswahl der Nachweismethode, sowie die Entscheidung über die Verdünnung des WST-1-Reagens im Versuch. Weiterhin stellte sich allein das Absaugen des Mediums als am schonendsten für den Biofilm bei der Prozessierung heraus. Ein weiterer elementarer Schritt war das Zentrifugieren des WST-Gemisches nach Inkubation, um den Umsatz zu beenden. Diese Ergebnisse stellten die wichtigsten Grundlagen für die folgenden Versuchsreihen dar.

5.3.2 Hauptversuch

5.3.2.1 Bonding

Wie in verschiedenen Untersuchungen nachgewiesen wurde, besitzt auspolymerisiertes Komposit keine zytotoxische Wirkung auf eukaryontische Zellen mehr [26, 57]. Entscheidend ist hierbei die Polymerisation. Nach korrekter Beleuchtung kann kein austretendes Monomer mehr festgestellt werden [26]. Zudem konnte nach dem vollständigen Aushärten keine Reduktion der Zellvitalitätsrate nach 28 Tagen registriert werden [57]. Erstaunlich ist das Ergebnis der Versuchsreihen im Flüssigmedium, nach welchem allein mit polymerisiertem Bonding beschichtete Proben eine zumindest ausgeprägte antiadhäsive Wirkung aufwiesen. Im Agardiffusionstest war keine bakterizide Wirkung des reinen Komposits nachzuweisen. Somit diffundiert der Wirkstoff, der eine Anhaftung verhindert, oder gar bakterizid wirkt, nicht aus der Beschichtung heraus. Nach der Polymerisation wurde die Sauerstoffinhibitionsschicht, die sich bei der Polymerisation des Kunststoffes bildet, nicht entfernt. Diese Dispersionsschicht bildet sich an der Oberfläche bei der Polymerisation des Komposits. Monomerketten reagieren an der Oberfläche mit dem Luftsauerstoff und bilden so diese oberflächliche, nicht vollständig polymerisierte Kompositschicht, ohne welche eine Verbindung mit

nachfolgenden Materialportionen nicht möglich wäre. Aufgrund der Ergebnisse des Agardiffusionstests wurde nicht mit einer solchen Wirkung des Bondings in der Flüssigkultur gerechnet. Allerdings wäre es möglich, dass aufgrund unzureichender Polymerisation übermäßig viel unpolymerisiertes Monomer in der Beschichtung vorhanden war. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da die Polymerisationslampe vor der Beschichtung auf ihre abgegebene Lichtintensität überprüft und vor den eigentlichen Versuchsreihen bereits über 250 Probenträger beschichtet wurden, sodass ein methodisch falsches Vorgehen ausgeschlossen werden kann.

Warum so wenig Keime auf der Oberfläche der mit Bonding beschichteten Probenträger binden und Kolonien bilden konnten und zudem die Bakterienzahl im Medium ebenfalls reduziert war, bleibt Spekulation und müsste im Rahmen einer weiteren Studie geklärt werden. Denkbar wäre eine möglicherweise geringere Wachstumsrate der Bakterien durch eine eventuelle Bakterizidie des Komposits oder einen antiadhäsiven Effekt des Bondingkomposits, vergleichbar dem Wirkprinzip des Delmopinol .

5.3.2.2 Ergebnisse des Hauptversuchs

Die Statistik zeigte eine signifikante Wirksamkeit des Komposits wie auch der Verdünnungen gegenüber den Vergleichsproben. Als erstaunlich kann sicherlich das Resultat angesehen werden, dass zwischen dem reinen Kunststoff und den Wirkstoffverdünnungen fast kein Unterschied bestand. Dies kann mehrere Gründe haben. Nachdem die Sauerstoffinhibitionsschicht nicht entfernt wurde, kann die Wirkung durch die an der Oberfläche liegenden Monomere verursacht worden sein. Weiter käme eine nicht vollständige Polymerisation der Proben in Betracht, was wiederum Monomere zur Ursache der vorliegenden Bakterizidie hätte. Dabei ist zu beachten, dass nicht jede Polymerisationslampe bei verschiedenen Kompositen den gleichen Polymerisationsgrad erreicht. Sigusch et al. legte dar, dass je nach Polymerisationslampe und verwendetem Komposit ursprünglich biokompatible Komposite eine Zelltoxizität aufweisen können [57]. Da es sich bei dem verwendeten Komposit um einen Haftvermittler für dentale Kunststoffe, handelt

könnte eine bestehende Toxizität in polymerisiertem Zustand von großem Vorteil sein. Durch große Temperaturschwankungen, mechanische Belastung, eventuell nicht exakte Verarbeitung und Anwesenheit kariogener Bakterien können mikroskopisch kleine Randspalten an Füllungen entstehen [61]. Diese wären durch eine antibakterielle Wirksamkeit des Haftvermittlers eventuell besser gegen Sekundärkaries geschützt. Allerdings ist die Anwesenheit zytotoxischer Monomere in einem lebenden Organismus als kritisch zu bewerten und diese zumindest einer Untersuchung der Toxizität auf den Gesamtorganismus bedürftig. Gegen eine systemische Verteilung spricht die Zulassung des Stoffes als Medizinprodukt. Vielleicht ist jedoch eine geringe, lokale bakteriostatische Wirkung vorhanden.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die biofilmhemmende Wirkung einer Taurolidinsuspension *in vitro* zu untersuchen. Taurolidin sollte, als Wirkstoff in einem Komposit als Matrix gebunden, auf seine Bakterizidie getestet werden. Da der Wirkstoff selbst keine Substantivität besitzt, muss er über eine Trägermatrix an den zu beschichtenden Körper gebunden werden. Hierzu wurde das leichtfließende, gefüllte Haftvermittlerkomposit OptiBond FL Phase 2 (Firma Kerr, USA) gewählt.

Zur Testung an monobakteriellen Biofilmen wurden als experimenteller Keim *Streptococcus mutans* DSM 20523 verwendet. Als Probenträger und Anlagerungsfläche für die Keime wurden standardisierte Reintitanplättchen gewählt. Diese wurden mit dem Taurolidin-Kunststoff-Gemisch in den Konzentrationen 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 und 1:64 beschichtet und danach mit *S. mutans* beimpft. Die anschließende Inkubation für 22 Stunden bei 37°C im Brutschrank erbrachte eine deutliche Biofilmbildung auf den Leerproben.

Die auf den Proben entstandenen Biofilme wurden mit WST-1-Reagens versetzt, welches über Aktivität von Dehydrogenasen lebensfähige Bakterien auf der Probe nachweist.

Die beschichteten Proben wiesen durchgehend einen antibakteriellen Effekt auf. Jedoch war die biofilmhemmende Wirkung des Taurolidingemisches gegenüber dem reinen Bonding erst ab einer Verdünnung von 4 Teilen Bonding zu 1 Teil Taurolidin sowie 2 zu 1 signifikant nachzuweisen. In der Literatur wird eine auspolymerisierte Kompositoberfläche als relativ biokompatibel und nicht zelltoxisch für eukaryote Zellen bezeichnet [26, 57]. Im Gegensatz zu Montanaro et al, welche in Aufwuchsversuchen keine Unterschiede zwischen Bakterienzahlen auf Polystyrol und Komposit gefunden hatten [62], zeigte diese Studie einen signifikanten Unterschied zwischen Polystyrol und der Kompositoberfläche auf. Aufgrund der fehlenden bakteriotoxischen Wirkung des polymerisierten OptiBond FL im Agardiffusionstest wird eine von der Oberfläche ausgehende antiadhäsive Wirkung vermutet. Die dabei zugrunde liegenden Mechanismen bedürfen weiterer Untersuchung.

7 Literaturverzeichnis

1. Rosan, B., Lamont, R.J.: Dental plaque formation. *Microbes Infect*, Nov. 2000 2(13): 1599-607
2. Gibbons, R.J., Moreno, E.C., Etherden, I.: Concentrationdependent multiple binding sites on saliva treated hydroxyapatite for *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun*, 1983 39: 280-289
3. Slots, J., Gibbons, R.J.: Attachment of *Bacteroides melanogenicus* subsp. *asaccharolyticus* to oral surfaces and its possible role in the colonization of the mouth and periodontal pockets. *Infect Immun*, 1978 19: 254-264
4. Mc Bride, B.C., Van der Hoeven, J.S.: Role of interbacterial adherence in colonization of the oral cavities of gnotobiotic rats infected with *S. mutans* and *Veillonella alcalescens*. *Infect Immun*, 1981 33: 467-472
5. Khoury, A.E., Lam, K., Ellis, B, Costerton, J.W.: Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. *ASAIO Journal*, 1992 38: M174-M178
6. Ruseska, I, Robbins, J., Costerton J.W., et al: Biocide testing against corrosion-causing oilfield bacteria helps control plugging. *Oil Gas J*, 1982: 253-264
7. Donlan, R.M., Costerton, J.W.: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002 15(2): 167-193
8. Costerton J.W., Geesey, G.G., Cheng, G.K.: How bacteria stick. *Sci Am* 1978 238: 86-95

-
9. de Beer, D., Stoodley, P., Lewandowski, Z.: Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnol Bioeng* 1994 44: 636-641
 10. Marsh, P.D.: Dental plaque. In: *Microbial biofilms*, Herausgeber: Lapin-Scott, H.M., Costerton, J.W. 1995, Cambridge University Press.
 11. Vincent, F.C., Tibi, A.R., Darbord, J.C.: A bacterial biofilm in a hemodialysis system. Assessment of disinfection and crossing of endotoxin. *ASAIO Trans* 1989 35: 310-313.
 12. Federle M.J., Bassler, B.L.: Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* 2003 112: 1291-1299.
 13. Lehnert, S., Heuser, H.S.: Zur sogenannten topographischen Bakteriologie der Mundhöhle in Abhängigkeit vom Altersablauf. *Dtsch Zahnärztl Z* 1968 23: 267-274.
 14. Socransky, S.S.: Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res* 1970 49: 203-222.
 15. Mandel, I.D.: Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* 1988 15: 488-498.
 16. Arnold, M., Gerhardt, G.: Die Bedeutung der Nebenwirkungen bei Chlorhexidin-Anwendung. *Zahnärztl Praxis* 1994 1+2: 6-8.
 17. Gjermo, P.: Pharmakodynamische Aspekte über die plaquehemmende Wirkung von Chlorhexidin. *Zahnärztl Welt* 1978 87: 337-338.
 18. Budtz-Jorgensen, E., Løe, H.: Chlorhexidine as a denture disinfectant in the treatment of denture stomatitis. *Scand Dent Res* 1972 80: 457-464.

-
19. Pucher, J.J., Daniel, J.C.: The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1993 62: 526-532.
 20. Helgeland, K., Heyden, G., Rolla, G.: Effect of chlorhexidine on animal cells in vitro. *Scand Dent Res* 1971 79: 209-215.
 21. Goldschmidt, P., Cogen, R., Taubmann, S.: Cytopathologic effects of chlorhexidine on human cells. *J Periodontol* 1977 48: 212-215.
 22. Brex, M.: Strategies and agents in supragingival chemical plaque control. *Periodontology* 2000 1997 15: 100-108.
 23. Brückner, W.L., Pfirrmann, R.W.: Einführung und Übersicht. In: „Taurolin - Ein neues Konzept zur antimikrobiellen Chemotherapie chirurgischer Infektionen“ 1985 Urban & Schwarzenberg, Donauwörth: 3-23.
 24. Brückner, W.L., Pfirrmann, R.W.: Pharmakokinetics of Taurolidine. In: „Taurolin - Ein neues Konzept zur antimikrobiellen Chemotherapie chirurgischer Infektionen“ 1985 Urban & Schwarzenberg, Donauwörth: 48-50.
 25. Schweikl, H., Spagnuolo, G., Schmalz, G.: Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 2006 85(10): 870-877.
 26. Kaga, M., Noda, M., Ferracane, J.L., Nakamura, W., Oguchi, H., Sano, H.: The in vitro cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929 cells. *Dent Mater* 2001 17(4): 333-339.

-
27. Gambin, N.K.: Über die Diffusion von HEMA (Hydroxyethyl-Methacrylat) durch humanes Dentin bei selbstkonditionierenden Bondingsystemen im Vergleich zu Totalätzsystemen in vitro. 2005: 10-11 (Zahnmedizinische Dissertation, Universität Bonn)
 28. Donlan, R.M.: Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002 8(9): 881-890.
 29. Issa, Y, Watts, D.C., Brunton, P.A., Waters, C.M., Duxbury, A.J.: Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater* 2004 20(1): 12-20.
 30. Flemming, H.-C., Wingender, J., Griegbe, Mayer, C.: Physico-chemical properties of biofilms. In: "Biofilms: recent advances in their study and control" Herausgeber: Evans, L.V. 2000, Harwood Academic Publishers: 19-34.
 31. Lewandowski, Z.: Structure and function of biofilms. In: "Biofilms: recent advances in their study and control" Herausgeber: Evans, L.V. 2000, Harwood Academic Publishers 2000: 1-17.
 32. Hausner, M., Wuertz, S.: High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl Environ Microbiol* 1999 65: 3710-3713.
 33. Ehlers, L.J., Bouwer, E.J.: RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor. *Water Sci Technol* 1999 7: 163-171.
 34. Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G.: *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol* (2002) 184: 1140-1154.

-
35. Pfirrmann, R.W.: Taurolin: Ein neues Konzept zur antimikrobiellen Chemotherapie chirurgischer Infektionen. In „Taurolin: Ein neues Konzept zur antimikrobiellen Chemotherapie chirurgischer Infektionen“ 1985 Urban & Schwarzenberg, Donauwörth. 3-13.
36. Lob, G., Burri, C.: Perioperative Wundspülung - Vergleich Taurolidin 1% und Nebactin-Lösung. In „Taurolin: Ein neues Konzept zur antimikrobiellen Chemotherapie chirurgischer Infektionen“ 1985 Urban & Schwarzenberg, Donauwörth: 136-142.
37. Lob, G., Burri, C., Ulrich, Ch.: Postoperative Behandlung nach Anwendung von Taurolidin-Gel 4%ig in der Osteitis Therapie; Ergebnisse bei 255 nachkontrollierten Patienten. In „Taurolin: Ein neues Konzept zur antimikrobiellen Chemotherapie chirurgischer Infektionen“ 1985 Urban & Schwarzenberg, Donauwörth: 158-163.
38. Görtz, G., Häring, R., Tzannetakis, P.: Erfahrung mit Taurolidin und Polyvidon-Jod in der Lokalbehandlung der diffusen Peritonitis. In „Taurolin: Ein neues Konzept zur antimikrobiellen Chemotherapie chirurgischer Infektionen“ 1985 Urban & Schwarzenberg, Donauwörth: 206-215.
39. Baker, D.M., Jones, J.A., Nguyen-Van-Tam, J.S., Lloyd, J.H., Morris, D.L., Bourke, J.B., Steele, R.J., Hardcastle, J.D.: Taurolidine peritoneal lavage as prophylaxis against infection after elective colorectal surgery. *Br J Surg* 1994 81(7): 1054-1056.
40. Geron, R., T.O., Kristal, B.: Catheter lock solution taurolock for prevention of catheter-related bacteremia in hemodialysis patients. *Harefuah* Dez 2006. 145(12): 881-4, 943.

-
41. Sherertz, R.J., Boger, M.S., Collins, C.A., Mason, L., Raad, I.I.: Comparative In Vitro Efficacies of Various Catheter Lock Solutions. *Antimicrob Agents Chemother* 2006. 50(5): 1865-1868.
42. Jacobi, C.A., Menenakos, C., Braumann, C.: Taurolidine - a new drug with anti-tumor and anti-angiogenic effects. *Anticancer Drugs* 2005 16(9): 917-921.
43. Braumann, C., Stuhldreier, B., Bobrich, E., Menenakos, C., Rogalla, S., Jacobi, C.A.: High doses of taurolidine inhibit advanced intraperitoneal tumor growth in rats. *J Surg Res* 2005 129(1): 129-135.
44. Jurewitsch, B., Jeejeebhoy, K.N.: Taurolidine lock: the key to prevention of recurrent catheter-related bloodstream infections. *Clin Nutr* 2005 24(3): 462-465.
45. Zimmermann, M., Preac-Mursic, V.: In vitro activity of taurolidine, chlorophenol-camphor-menthol and chlorhexidine against oral pathogenic microorganisms. *Arzneimittelforschung* 1992 42(9): 1157-1159.
46. Fenicia, L., Anniballi, F, De Medici, D, Delibato, E, Aureli, P.: A SYBR-Green Real-Time PCR method to detect *Clostridium botulinum* Type A. *Appl Environ Microbiol* May 2007 73(9): 2891-2896
47. Bayston, R., et al.: Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* on biomaterials in vitro and in vivo: Impact on diagnosis and treatment. *J Biomed Mater Res A* Dec 2006 81A(3): 705-709.
48. Thurnheer, T., Gmur, R., Guggenheim, B.: Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. *J Microbiol Methods* 2004 56(1): 37-47.

-
49. Nandakumar, K., Obika, H., Utsumi, A., Ooie, T., Yano, T.: In vitro laser ablation of natural marine biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2004 70(11): 6905-6908.
50. Stupp, C.H., Dalchow, C., Grun, D., Stupp, H.F., Wustrow, J.: Three years of experience with titanium implants in the middle ear. *Laryngorhinootologie* 1999 78(6): 299-303.
51. Fugazzotto, P.A.: Immediate implant placement and GBR in humans: a case report and histologic evaluation. *Int J Periodontics Restorative Dent* Oct 1999 19(5): 457-463.
52. Lavos-Valereto, I.C., Konig, B., Rossa, C. Jr, Marcantonio, E. Jr, Zavaglia, A.C.: A study of histological responses from Ti-6Al-7Nb alloy dental implants with and without plasma-sprayed hydroxyapatite coating in dogs. *J Mater Sci Mater Med*. 2001 12(3): 273-276.
53. Huang, Q., Fu, W.L.: Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2005 43(8): 841-842.
54. Costerton, J.W.: Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 1995 15(3): 137-140.
55. Gilbert, P., Das, J., Foley, I.: Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 1997 11(1): 160-167.
56. Sigusch, B.W., Volpel, A., Braun, I., Uhl, A., Jandt, K.D.: Influence of different light curing units on the cytotoxicity of various dental composites. *Dent Mater* Nov 2007 23(11): 1342-1348.

-
57. Barbour, M.E., O'Sullivan, D., Jenkinson, H.F., Jagger, D.C.: The effects of polishing methods on surface morphology, roughness and bacterial colonisation of titanium abutments. *J Mater Sci Mater Med* Jul 2007 18(7): 1439-1447
58. Cook, J.A., Mitchell: The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Anal. Biochem.* 1989 179: 1-7.
59. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Meth* 1983 65: 55-63.
60. Krämer, N., Kunzelmann, K.H., García-Godoy, F., Häberlein, I., Meier, B., Frankenberger, R.: Determination of caries risk at resin composite margins. *Am J Dent* 2007 20(1): 59-64.
61. Montanaro, L., Campoccio, D., Rizzi, S., Donati, M.E., Breschi, L., Prati, C., Arciola, C.R.: Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. *Biomaterials* 2004 25(18): 4457-4463.
62. Arweiler, N., Sculean, A., Ausschill, T.: Der Wirkstoff Delmopinol - eine Alternative zu Chlorhexidin? *Schweiz. Monatsschr. Zahnmed.* 2003 113: 136-142.
63. Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C.J., Wilson, S., Klapper, I.: Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2002 29(6): 361-367.
64. Szymanska, J.: Biofilm and dental unit waterlines. *Ann Agric Environ Med* 2003 10(2): 151-157.

8 Anhang

8.1 Verwendete Bakterienstämme

Tab. 6: Bakterienstammliste

Streptococcus sanguinis; Biotype 1, serologische Gruppe H. Murein A11.6, DSM Nr.: 20068	Institut für Mikrobiologie und Hygiene	Würzburg
Staphylococcus epidermidis; Stamm Rp62A	Institut für molekulare Infektionsbiologie	Würzburg
Streptococcus mutans; serologische Gruppe C. Murein A11.5(3228), DSM Nr.: 20523	Institut für Mikrobiologie und Hygiene	Würzburg

8.2 Verwendete Geräte

Tab. 7: Geräteliste

Gerät	Hersteller	Ort
Autoklav	Melag	Berlin
Brutschrank	Heraeus	Hanau
Erlenmeyer Kolben	Versand Hartenstein	Würzburg
Folienschweißgerät Hygropac	Dürr	Bietigheim-Bissingen
Heizplatte RCT basic	IKA Werke	Stauffen
Glas Laborflaschen	Schott	Mainz
Lichtmikroskop Axiolab	Carl-Zeiss	Jena
Motor Pipette Accu-Jet	Brandt	Wertheim
Multipette Plus	Eppendorf	Hamburg
PH-Meter	Ino Lab, WTW	Weilheim
Photometer SpectraFluorPlus	Tecan	Crailsheim
Pinzette, BD 520	Aesculap	Melsungen
Schüttler Novotron	Infors	Bottmingon-CH
Software Magellan III	Gauss Enterprise	Hamburg

Sterilbank Lamin Air HB 2427	Heraeus	Hanau
Vortex	Heidolph	Schwabach
Feinwaage	Scaltec Instruments	Weiligenstadt
Vivapad	Ivoclar Vivadent GmbH	Ellwangen
Elipar FreeLight Polymerisationslampe	3M ESPE AG	Seefeld
Pinselhalter	3M ESPE AG	Seefeld
Mikro 20 Zentrifuge	Hettich	Tuttlingen

8.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tab. 8: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Ort
Autoklaviertüten Hygrofol	Dürr	Bietigheim-Bissingen
Blutagarplatten (Trypticase soy agar II with 5% sheep blood)	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg
Einmalpipetten 5, 10, 25 ml	Greiner	Frickenhausen
Einmalpipetten Multipette Plus 10 ml	Eppendorf	Hamburg
Titanplättchen: Titan Grade 2; Durchmesser 15,5 mm Dicke 0,6 mm	Universitätseigene Werkstatt	Würzburg
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg
Pasteur Pipetten (Glas)	Versand Hartenstein	Würzburg
Pipettenspitzen gelb, blau	Eppendorf	Würzburg
Zellkulturplatte 24 Well	Greiner	Frickenhausen
Zellkulturplatte 96 Well	Greiner	Frickenhausen
Greiner Schraubverschlussröhrche n 15, 50 ml	Greiner	Frickenhausen
OptiBond FL Phase 2 LOT 432580	Kerr	Orange, USA
Nylon Pinselspitzen	Henry Schein	New York, USA

8.4 Verwendete Chemikalien

Tab. 9: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Ort
BBL Schädler Nährmedium (Fertigmedium)	Becton Dickinson	Heidelberg/Sparks-USA
Thioglykolat Nährmedium (Fertigmedium)	Becton Dickinson	Heidelberg/Sparks-USA
Taurolidin Pulver (non cGMP production) 99.5% Reinheitsgrad	Institut für Pharmazeutische Chemie	Würzburg
WST-Reagens	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim
DNA Farbstoff Sybr Green I	MoBiTec	Göttingen
Gram Färbung	Infektionsbiologie	Würzburg
KCl Art. Nr. 1.04936	Merck KGaA	Darmstadt
KH ₂ PO ₄ Art. Nr. 1.04873	Merck KGaA	Darmstadt
NaCl Art. Nr. 1.06404	Merck KGaA	Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ x12H ₂ O Art. Nr. 1.06579	Merck KGaA	Darmstadt
Hefeextrakt, Art. Nr. 211929	Fa. Difco, Vertrieb: Fa. Becton- Dickinson GmbH	Heidelberg/Sparks USA
Tryptone, Art. Nr. 211705	Fa. Difco, Vertrieb: Fa. Becton- Dickinson GmbH	Heidelberg/Sparks USA
SDS 2%	Apotheke des Universitätsklinikums	Würzburg
Extran MA 03	Merck KgaA	Darmstadt
Isopropylalkohol	Apotheke des	Würzburg

(2-Propanol)	Universitätsklinikums	
--------------	-----------------------	--

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. dent. Ulrich Schlagenhaut danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und die Beratung.

Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde, insbesondere Frau Dr. rer. nat. Andrea Ewald und Frau Ursula Rummel für ihre freundliche Unterstützung.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name Dierfeld Jan Michael
Wohnort Uhlandstr. 11
83071 Stephanskirchen
Telefon 08031/2356545
0176/21934983
Email Jandierfeld@gmx.de
Geburtstag und –ort 10.3.1979 in Stuttgart
Familienstand ledig
Nationalität deutsch

Schulbildung

September 1985 – Juli 1998

Michael – Bauer – Waldorfschule
in Stuttgart Vaihingen

Juli 1998

Abschluss: Abitur

Wehersatzdienst

Dezember 1998 – Dezember 1999

Rettungsdienst des Deutschen Roten
Kreuzes Stuttgart

Berufsausbildung

Oktober 2000 – Februar 2003

Vorklinisches Studium / Würzburg

März 2003

Zahnärztliche Vorprüfung

April 2003 – Juli 2005

Klinisches Studium / Würzburg

Juli 2005 – November 2005

Staatsexamensprüfungen

Dezember 2005

Abschluss: Staatsexamen

Dezember 2005

Approbation als Zahnarzt, Würzburg

