

Aus der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde
der Universität Würzburg

Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

**Antimikrobielle Eigenschaften von Calciumalkaliphosphat dotierten
Polymermatrices**

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

vorgelegt

von
Karolin Marion Köhler
aus Münnerstadt - Großwenkheim
Würzburg, Dezember 2011



Referent: Prof. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck

Korreferent: Prof. Dr. med. Ulrich Vogel

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2013

Die Promovendin ist Zahnärztin

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2. KENNTNISSTAND	6
2.1 Bakterien in der Mundhöhle.....	6
2.2 Antimikrobiell wirksame Substanzen in der Zahnheilkunde.....	8
2.3 Etablierte antimikrobiell wirksame Füllungsmaterialien	12
2.4 Antimikrobiell wirksame Komposite	14
3. MATERIAL UND METHODEN.....	16
3.1 Vorgehensweise	16
3.2 Präparative Arbeiten.....	17
3.3 Oberflächenanalyse mittels Rasterelektronenmikroskop.....	21
3.4 Analyse des Bakterienwachstums auf den Oberflächen	21
3.5 pH-Wertbestimmung bei Prüfkörpern in LB-Medium	25
3.6 Bestimmung der Konversionsrate durch Raman-Spektroskopie	26
3.7 Biegefestigkeitsversuch.....	26
3.8 Röntgenopazitätstest.....	27
3.9 Demineralisations- und Remineralisationstest.....	28
3.10 Statistik und Berechnung.....	30
4. ERGEBNISSE	31
4.1 Oberflächenanalyse mittels REM-Aufnahmen.....	31
4.1 Test der antimikrobiellen Eigenschaften.....	32
4.2 Verlauf der pH-Wertmessung	42
4.3 Konversionsrate	42
4.4 Biegefestigkeit	44

4.5 Röntgenopazität	45
4.6 Remineralisations- und Demineralisationsverhalten.....	46
5. DISKUSSION	48
5.1 Ausgangspunkt.....	48
5.2.Wirkung und Reaktion	49
5.3 Herstellung der Prüfkörper und Durchführung des antimikrobiellen Tests	50
5.4 Eigenschaften.....	51
5.5 Bedeutung für die Klinik.....	56
6. ZUSAMMENFASSUNG	57
7. LITERATURVERZEICHNIS	59

Verwendete Abkürzungen und Formeln:

Bis-GMA	-	Bisphenol-A-Glycidyl-Methacrylat
CHX	-	Chlorhexidinglukonat
$\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$	-	CPSP - Calciumkaliumnatriumphosphat
CaKPO_4	-	CCP - Calciumkaliumphosphat
CaNaPO_4	-	CSP - Calciumnatriumphosphat
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	-	Calciumhydroxid
DMAE-CB	-	Methacryloxyethylcetyldimethylammoniumchlorid
H_2O_2	-	Wasserstoffperoxid
H_3PO_4	-	Orthophosphorsäure
HF	-	Fluorwasserstoff
LB	-	lysogeny broth
MDPB	-	Methacryloxydodecylpyridinbromid
NaOCl	-	Natriumhypochlorid
PBS	-	phosphate buffered saline
PMMA	-	Polymethylmethacrylat
REM	-	Rasterelektronenmikroskop
SiO_2	-	Siliciumdioxid
TCP	-	Tricalciumphosphat
TEGDMA	-	Triethylenglycoldimethacrylat
WST-1	-	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolium]-1,3 Benzendisulfonat (water soluble tetrazolium)
YbF_3	-	Ytterbiumfluorid
YF_3	-	Yttriumfluorid

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Von Geburt an wird die Mundhöhle von Bakterien besiedelt, mit Durchbruch der Zähne bieten sich mit diesen und dem Zahnsulkus neue Flächen zur Anlagerung. Der menschliche Körper besitzt gegen bakterielle Infektionen in der Mundhöhle eigene Abwehrsysteme, wie Speichel, Sulkusfluid und die Epithelbarriere der Schleimhäute. Darüber hinaus können Zahnpflege und Ernährung des Menschen Einfluss auf die Zahngesundheit nehmen. Dennoch kann es zur Infektion der Zahnhartsubstanz mit Karieserregern sowie zum Knochenabbau durch Parodontitiserreger kommen.¹

Auch auf einer kurz zuvor gereinigten Zahnoberfläche bildet sich innerhalb von kürzester Zeit wieder der initiale orale Biofilm, die so genannte Pellikel, aus, welcher für den Zahn einerseits eine protektive, andererseits eine pathophysiologische Wirkung aufweist. Dieser Biofilm ist Grundlage für die bakterielle Besiedlung von exponierten Oberflächen.² Nach heutiger Auffassung handelt es sich bei der Karies um eine Infektionskrankheit. An der Schmelzoberfläche des Zahnes sind primär säureproduzierende Mikroorganismen, vor allem *Streptococcus mutans* für die initiale Kariesläsion verantwortlich. Niedermolekulare Kohlenhydrate aus der Nahrung werden zu Lactat verstoffwechselt, wodurch es zu einem Abfall des pH-Wertes an der Zahnoberfläche kommt. Hieraus resultiert eine Demineralisation des Schmelzes, die anhält, solange Säuren produziert werden. Durch Kalzium und Phosphat können an der Oberfläche wieder neue Kristalle gebildet werden, die eine pseudointakte Schicht erzeugen. Der kritische pH-Wert für den Zahnschmelz liegt bei 5,2 - 5,7, für Dentin bei 6,2 - 6,7. Nachdem die Läsion die Schmelz-Dentin-Grenze erreicht hat, unterscheidet man die Zone der Demineralisation, der Penetration und der Nekrose.^{3,4}

Studien zeigen heute einen deutlichen Rückgang des Kariesbefalls in den hochindustrialisierten Ländern, was beispielsweise durch die vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV) dargestellt wurde.⁵ Dies ist insbesondere zurückzuführen auf bessere Prophylaxemaßnahmen im Kindes- und Jugendalter. Hier sind vor allem die verbesserte Mundhygiene einschließlich

häuslicher Fluoridanwendung, sowie Gruppenprophylaxe und Fissurenversiegelungen mit Kompositen zu erwähnen.⁶ Auch durch Trinkwasserfluoridierung, wie beispielsweise in Australien oder den USA konnte ein Kariesrückgang erreicht werden. In Ländern wie Deutschland oder auch der Schweiz gibt es keine Fluoridierung des Trinkwassers, weil befürchtet wurde, dass eine Überversorgung stattfinden könne, da bereits das Speisesalz Fluorid enthält.⁷

Trotz dieser Maßnahmen stellt sowohl die Karies als auch die so genannte Sekundärkaries weiterhin ein Problem dar. Die Sekundärkaries, die auch als „Randspaltkaries“ bezeichnet wird, tritt an den Rändern von Zahnfüllungen, Inlays oder Kronen auf. Die Bakterien der Mundhöhle können hier über den Randspalt zwischen Zahnhartsubstanz und Restauration eindringen. Bakterien, die bei der Präparation der Zahnhartsubstanz am Boden der Kavität und somit unterhalb der Restauration oder Füllung verblieben sind, können ebenfalls zu Karies in Form eines so genannten Kariesrezidivs führen. Dieses gleicht in seiner Ätiologie weitgehend der primären Karies, ist aber schwieriger zu diagnostizieren.^{8,9} Um nach der Entfernung von kariöser Zahnhartsubstanz die entstandene Kavität zu füllen, werden unter anderem Komposite und Amalgam benutzt. Amalgamfüllungen, die gegenwärtig Bestandteil der Leistungen der gesetzlichen Krankenkassen als Füllungswerkstoff im Seitenzahnggebiet sind, werden von einigen Patienten abgelehnt. Dies geschieht zum einen aus ästhetischen Gründen, zum anderen aus Angst vor eventuellen Allergien oder Unverträglichkeiten.¹⁰

Bereits seit 1945 wurden Polymethylmethacrylate in der Zahnmedizin als Füllungswerkstoffe anstelle von Silikatzementen eingesetzt. Im Jahre 1962 gelang es Bowen, das erste klinisch brauchbare Komposit herzustellen.¹¹ Unter Kompositen versteht man in der konservierenden Zahnheilkunde zahnfarbene und plastische Füllungsmaterialien, die in die Kavität eingebracht werden. Ebenso gehört zu den üblichen Anwendungsgebieten die Herstellung von Inlays aus Komposit im direkten oder indirekten Verfahren, wobei hier in die Füllung dem Inlay aufgrund substanzschonender Präparation und geringerer Kosten vorzuziehen ist.¹² Komposite setzten sich nach und nach gegenüber anderen

Materialien durch. Als Vorteile zeigten sich die geringere Löslichkeit, bessere Farbstabilität, leichtere Handhabbarkeit und gute Polierbarkeit. Zu den Nachteilen zählen die hohe Polymerisationsschrumpfung, die starke Abrasion und der große Ausdehnungskoeffizient.¹³

Ein Komposit besteht grundsätzlich aus einer organischen und einer anorganischen Komponente, die durch eine weitere Komponente verbunden werden. Hierzu benötigt man bifunktionelle Silane, die sich chemisch mit dem Füller verbinden und über den hydrophoben Molekülteil in die Polymermatrix eingebunden werden. Die organische Komponente oder Matrix wiederum besteht aus Dimethacrylat-Monomeren, wie Bis-GMA (Bisphenyl-A-Glycidyl-Dimethacrylat), Co-Monomeren, wie dem Verdünnungsmittel TEGDMA (Triethylenglycol-dimethacrylat) und verschiedenen Additiven, wie zum Beispiel Initiatoren, Inhibitoren und Photostabilisatoren. Eine typische Zusammensetzung besteht aus 75 Masse-% Bis-GMA und 25 Masse-% TEGDMA.¹⁴ Die anorganische Komponente bildet den Füllstoff des Komposits, nach der auch die bekannteste Klassifikation erfolgt: Makrofüllerkomposite, homogene oder inhomogene Mikrofüllerkomposite und Hybridkomposite. Konventionelle Komposite enthalten Makrofüller in einem Größenbereich zwischen 1 und 100 µm aus Quarz, Glas oder Keramik. Sie gelten als nicht polierbar, da es zum Herausbrechen der Füllkörper aus der Matrix und einer Aufrauung einer zuvor polierten Oberfläche kommt und somit zur Plaqueanlagerung führen kann. Modernere Komposite hingegen enthalten Mikrofüller mit einer Größe unter 1 µm aus feinstteiligen SiO₂-Partikeln, um die Abrasionsfestigkeit zu steigern. Inhomogene Mikrofüllerkomposite unterscheiden sich von den homogenen dadurch, dass ihnen splitterförmige, beziehungsweise kugelförmige Vorpolymerisate oder Füllkörperagglomerate zugesetzt sind, um einen akzeptablen Füllergehalt zu erhalten. Hybridkomposite wurden entwickelt, um die guten mechanischen Eigenschaften der Makrofüllerkomposite mit den guten Abrasionseigenschaften der Mikrofüllerkomposite zu kombinieren. Von Feinstpartikelhybridkompositen spricht man, wenn die Makrofüller einen Durchmesser von unter 1,5 µm haben. Weiterhin kommen Füllkörper im Nanometerbereich bei den sogenannten

Nanofüllerkompositen zum Einsatz.¹⁵ Komposite werden über die so genannte Säureätztechnik in die Kavität eingebracht. Im Allgemeinen wird für die Schmelzkonditionierung 30 - 40%ige Orthophosphorsäure (H_3PO_4) verwendet, die über einen Zeitraum von 30 - 60 Sekunden einwirkt. Danach muss der angeätzte Schmelz mit Wasser entfernt und die Kavität getrocknet werden. Nun muss der konditionierte Schmelz mit dem Komposit verbunden werden, was über unterschiedliche Haftvermittler-Systeme, wie beispielsweise mittels Primer (hydrophiles Monomer) und Bonding (niedrigvisköses Komposit) erfolgen kann. Diese können in die so genannten „Tags“ der Zahnhartsubstanz eindringen und sorgen durch die Sauerstoffinhibition an der Oberfläche für die chemische Verbindung mit dem Füllungskunststoff. Die Aushärtung kann entweder chemisch oder über Lichthärtung erfolgen. Es wird hier schichtweise vorgegangen, um die Polymerisationsschrumpfung zumindest teilweise zu kompensieren. Diese liegt bei modernen Kompositen zwischen 1,7 und 6 Vol.% und bedingt Spannungen im Material und Randspaltbildungen.¹⁶ Ziele der Weiterentwicklung von Kompositen sind verbesserte mechanische Eigenschaften, reduzierte Polymerisationsschrumpfung und Umsatzraten, geringere Wasseraufnahme und Löslichkeit. Auch wird nach weiteren Möglichkeiten der antimikrobiellen Wirkungen gesucht.¹⁴

Bei der Entwicklung eines antimikrobiell wirksamen dentalen Werkstoffes wurden bislang drei Wege beschritten. Die Wirkung kann mittels eines löslichen Bestandteils, wie beispielsweise Fluorid erfolgen, der wieder freigesetzt wird.¹⁷ Eine andere Methode zielt darauf ab, einen antibakteriell wirksamen Bestandteil in den Werkstoff zu integrieren. Hier wiederum gibt es die Möglichkeit, dies über die organische Komponente, wie beispielsweise MDPB (Methacryloyldodecylpyridinbromid), oder den Füllkörper, wie beispielsweise an SiO_2 gebundene Silberionen, zu erreichen.^{18,19,20} Als dritte Möglichkeit wird eine Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit von Füllungswerkstoffen gesehen, die so modifiziert wird, dass eine Bakterienadhäsion erschwert wird.²¹

Ziel dieser experimentellen Arbeit war es, ein antimikrobiell wirksames Komposit herzustellen, indem Calciumalkaliphosphate als Füllstoffe in die organische Matrix eingebracht wurde. Es wurden mechanisch aktiviertes Calciumnatriumphosphat (CaNaPO_4), Calciumkaliumphosphat (CaKPO_4) und Calciumkaliumnatriumphosphat ($\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$) als Füllstoffe verwendet, bei denen in einer mineralischen Zementmatrix zuvor bereits antimikrobielle Eigenschaften aufgrund der stark alkalisch verlaufenden Abbindereaktion nachgewiesen werden konnten.²² Als organische Matrices wurden in Vorversuchen zunächst radikalisch zu Polymethylmethacrylat (PMMA) polymerisierendes Methylmethacrylat (MMA) verwendet, während in weiterführenden Versuchsreihen lichthärtende Komposite aus Bis-GMA und TEGDMA eingesetzt wurden. Die neu entwickelten Werkstoffe wurden im Anschluß auf die antimikrobiellen Eigenschaften und ihre Eignung als dentales Komposit geprüft. Zur Testung der antibakteriellen Eigenschaften wurden die Prüfkörper mit Bakterien beimpft. Die Auswahl der untersuchten Keime erfolgte zunächst breitgefächert, da der Werkstoff prinzipiell auf seine antibakteriellen Eigenschaften, nicht nur auf den Bereich der Zahnerhaltung beschränkt, getestet werden sollte. Die Prüfkörper wurden mit *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* und einem Plaquemix, der exemplarisch am Patienten entnommen wurde, getestet und die antimikrobielle Wirksamkeit durch den in vorangegangenen Studien²³ etablierten WST-1 Test quantifiziert. Weitere Untersuchungen sollten andere Eigenschaften des neu entwickelten Werkstoffes aufzeigen: pH-Wert im umgebenden Milieu, Konversionsrate, Biegefestigkeit, Röntgenopazität sowie De- und Remineralisationsfähigkeit im Kontakt mit physiologischen Modellelektrolyten.

2. KENNTNISSTAND

2.1 Bakterien in der Mundhöhle

Die Mundhöhle ist mit mindestens 6 Millionen Bakterien und über 700 Bakterienarten besiedelt.²⁴ In folgender Tabelle sind die wichtigsten Krankheitsbilder der Mundhöhle und die indirekt oder direkt beteiligten Bakterienstämme dargestellt (**Tabelle 1**).^{25,26}

Auch auf einer zuvor gereinigten Zahnoberfläche bildet sich in kurzer Zeit wieder die so genannte Pellikel aus, welche für den Zahn einerseits eine schützende, andererseits eine schädigende Wirkung aufweist. Sie gilt als Grundlage für bakterielle Besiedlung von Zahnoberflächen.²⁷ Die Pellikel bildet sich in der ersten Phase, die nur wenige Sekunden dauert, durch die spontane Adsorption von Speichelproteinen aus. Dies wird darauf zurückgeführt, dass an der Schmelzoberfläche positiv geladene Calciumionen befinden, zu denen die sogenannte Vorläuferproteine Statherin, Histatin und die prolinreichen Proteine aus dem Speichel eine hohe Affinität aufweisen und sich anhaften. Es resultiert ein Ionenaustausch dieser Proteine mit den Phosphationen des Schmelzes und es kommt zur Bildung von Calciumbrücken zu den Proteinen. Es werden auch Muzine, Amylase, Cystatine, Lysozym, Carboanhydrasen, Lactoferrin und bakterielle Glycosyltransferasen in die Pellikel aufgenommen.^{2,28} Neben der ionischen Bindung zu Ca^{2+} spielen weiterhin hydrophobe Wechselwirkungen und Van- der- Waals-Kräfte bei der Anhaftung eine Rolle.²⁹ Nach der ersten Phase der Pellikelbildung folgt die länger andauernde Phase der kontinuierlichen Adsorption von Biomolekülen. Proteine und Mikroorganismen konkurrieren hierbei um die Oberfläche. In dieser Phase fehlen extrazelluläre Matrix und dreidimensionale Strukturierung. Pionierkeime lagern sich unspezifisch und reversibel an die Zahnoberfläche an, an der Pellikel hingegen entstehen spezifische, irreversible Bindungen, die über die Fimbrien einiger Bakterien zustande kommen. Bei fortschreitender Reifung zur Plaque entsteht extrazelluläre Matrix, die als typische Eigenschaften eines bakteriellen Biofilms anzusehen ist.^{2,30}

Übersicht über orale Krankheitsbilder und indirekt oder direkt beteiligte Bakterienstämme	
Krankheitsbild	Beteiligte Bakterienstämme
Karies	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Lactobacillus spp</i> , <i>Actinomyces viscosus</i>
Parodontale Erkrankungen, Chronische Gingivitis	<i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Streptococcus milleri</i> , <i>Actinomyces israelii</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Capnocytophaga spp</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Veillonella spp</i>
Chronische Parodontitis	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Selenomonas spp</i> , <i>Capnocytophaga spp</i> , <i>Spirochaetes</i>
Aggressive Parodontitis	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Capnocytophaga spp</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Tannerella forsythia</i>
Nekrotisierende, ulzerierte Gingivitis	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Treponema spp</i>
Dentoalveoläre Infektionen, Abszesse	<i>Prevotella spp</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Streptococcus milleri</i>
Angina Ludovici (Mundbodenphlegmone)	<i>Porphyromonas spp</i> , <i>Prevotella spp</i> , <i>Fusobacterium spp</i> , <i>Streptococcus spp</i>
Parodontaler Abszess	<i>Porphyromonas spp</i> , <i>Prevotella spp</i> , <i>Fusobacterium spp</i> , <i>Streptococcus spp</i> , <i>Capnocytophaga spp</i> , <i>Actinomyces spp</i>
Osteomyelitis	<i>Tannerella spp</i> , <i>Porphyromonas spp</i> , <i>Prevotella spp</i> , <i>Enterobacteria</i>
Actinomykosis	<i>Actinomyces israelii</i> , <i>Actinomyces bovis</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Speicheldrüseninfektionen, Parotisabszess	<i>Alpha haemolytic streptococci</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>

Tabelle 1 Übersicht über die typischen oralen Krankheitsbilder und die daran beteiligten Bakterienstämme ^{25,26}

Für die antimikrobiellen Tests dieser experimentellen Arbeit wurden, wie bereits erwähnt, verschiedenste Bakterienarten verwendet, die nicht alle im Bereich der Zahnheilkunde von großer Bedeutung sind. Grund hierfür war, dass die

antimikrobielle Wirksamkeit der Calciumalkaliphosphate, die bereits in Versuchen mit Calciumalkaliphosphatzementen bestätigt wurde,²² in polymeren Biomaterialien zuerst generell getestet werden sollte. Verwendet wurden *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius* und *Streptococcus mutans*. Zusätzlich wurde ein Plaquemix verwendet, der einer vom Patienten entnommenen Probe entstammt, und dessen genaue Zusammensetzung nicht bekannt ist.

Die Bakterienart *Klebsiella pneumoniae* verursacht beispielsweise Infektionen der Atemwege oder Harnwege. Durch Bildung einer β -Lactamase können sie Resistenzen gegen einige Antibiotika, wie zum Beispiel Carbapeneme, entwickeln.³¹ *Staphylococcus aureus* gehört zu den wichtigsten Erregern nosokomialer Infektionen und kann beispielsweise Infektionen der Haut und Schleimhäute, wie Abszesse (siehe auch **Tabelle 1**) oder eine bakterielle Endokarditis bedingen. Auch hier haben sich Resistenzen gegen β -Lactam- und andere Antibiotika gebildet.³² Die Bezeichnung MRSA bedeutet Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* oder auch multi-resistenter *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus epidermidis* besiedelt Haut und Schleimhäute, kann zu Infektionen an Kathetern oder Endoprothesen führen und besitzt ebenfalls Antibiotikaresistenzen.³³ Sowohl *Streptococcus salivarius* als auch *Streptococcus mutans* sind in der Mundhöhle vorzufinden und gehören zu den kariogenen Bakterien (siehe auch **Tabelle 1**), wobei man *Streptococcus mutans* als hauptsächlichen Karieserreger einstuft.⁴

2.2 Antimikrobiell wirksame Substanzen in der Zahnheilkunde

Unter einer antimikrobiellen Substanz versteht man im Allgemeinen einen Stoff, der die Vermehrungsfähigkeit oder Infektiosität von Mikroorganismen reduziert, sie abtötet oder inaktiviert. Im Bereich der Medizin und der Zahnheilkunde werden vielfach antimikrobielle Werkstoffe genutzt, um Infektionen zu vermeiden. Im Rahmen dieser Arbeit soll jedoch nicht detailliert auf diesen Themenbereich eingegangen werden, sondern nur gängige Werkstoffe im Bereich der Zahnheilkunde dargestellt werden. Antimikrobiell wirksame

Substanzen kommen hier zum Beispiel in Medikamenten zum Einsatz: Antibiotika richten sich dabei gegen Bakterien, Antimykotika gegen Pilze und Hefen und Antiparasitika gegen Parasiten. Daneben zählen auch Substanzen als antimikrobiell, die nicht der direkten Therapie dienen, sondern auch alle Desinfektionsmittel, die zusätzlich auch Viren inaktivieren können.³⁴

Relativ häufig werden in Zahnheilkunde Antibiotika eingesetzt. Antibiotikagruppen werden nach Wirkungsweisen und Angriffsort unterschieden. Sie wirken auf folgende Arten: bakteriostatisch (Hemmung des Wachstums und der Vermehrung des Bakteriums), bakterizid (Abtötung des Bakteriums) oder bakteriolytisch (Zellwandauflösung des Bakteriums). Weiterhin unterscheidet sich ihr Wirkungsspektrum, so sind einige Antibiotika sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien gleichsam wirksam, andere wiederum nur spezifisch. Zu den Problemen der Antibiotikatherapie gehört unter anderem die Resistenz einiger Bakterien. Darunter versteht man eine erworbene Widerstandsfähigkeit gegen ein Antibiotikum. Besteht eine Resistenz, führt die Antibiotikatherapie bei der Behandlung nicht mehr zum Bakterienabsterben oder einer Wachstumshemmung.³⁵ Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Tabelle der Übersicht über die Antibiotika und ihre Wirksamkeit gegen verschiedene Bakterienstämme dienen (**Tabelle 2**).

Im Bereich der Parodontologie gehören Antibiotika zusammen mit der sub- und supragingivalen Zahnreinigung zur Therapie einer aggressiven Parodontitis oder einer schwere chronische Parodontitis.^{36,37} Typische Bakterienstämme, die hieran beteiligt sind, sind **Tabelle 1** zu entnehmen. Die alleinige Therapie durch Antibiotika ist nur eingeschränkt wirksam, da sie die Biofilmstruktur an den Zahnoberflächen nur schwer durchdringen können.³⁸ Die Auswahl des geeigneten Antibiotikums sollte durch eine mikrobiologische Analyse der subgingivalen Plaque ermittelt werden.³⁹ Der sogenannte van Winkelhoff-Cocktail, der die Antibiotika Metronidazol und Amoxicillin enthält, wird bereits seit 1989 zur Therapie verwendet.⁴⁰

Häufiger kommen Antibiotika allerdings im Bereich der Chirurgie zum Einsatz. Die Therapie von dentogenen, pyogenen Infektionen, zu denen die apikale Parodontitis, Perikoronitis, der dentogene Abszess und die posttraumatische Infektion gehören, erfolgt chirurgisch, kann aber gegebenenfalls durch Antibiotikatherapie unterstützt werden, wenn die Gefahr der Reinfektion oder des Übergreifens auf benachbarte Strukturen besteht.⁴¹ Auch werden einem Patienten mit bestehendem Endokarditisrisiko vor einem chirurgischen Eingriff zur Prophylaxe einer Bakteriämie Penicillin oder Licosamide verabreicht.⁴²

	Angriffsorte	Wirkung	Beispiele
Aminoglycoside	Proteinsynthese	gramnegativ, bakterizid	Streptomycin
Cephalosporine (b-Lactam)	Zellwandsynthese	breites Spektrum, bakterizid	Cefotaxim
Glykopeptide	Zellwand	grampositiv, bakterizid	Vancomycin
Gyrasehemmer	DNA-Gyrase	grampositiv, bakterizid	Rifampicin
Licosamide	Proteinsynthese	grampositiv, bakteriostatisch	Clindamycin
Makrolide (Polyketid)	Proteinsynthese	grampositiv, bakteriostatisch	Erythromycin
Penicilline (b-Lactam)	Zellwandsynthese	grampositiv, bakterizid	Amoxicillin
Polymyxine (Polypeptid)	Zellmembran	Bakteriostatisch	Colistin
Sulfonamide	Folsäuresynthese	breites Spektrum, bakterizid/bakteriostatisch	Cotrimoxazol
Tetracycline (Polyketid)	Proteinsynthese	breites Spektrum, bakteriostatisch	Doxycyclin

Tabelle 2 Übersicht über die Antibiotika, ihre Angriffsorte, Wirkung und Beispiele⁴³

Neben diesen praktischen Anwendungsgebieten, gibt es auch Forschungen, deren Ansatz beispielsweise eine antibiotische Beschichtung von Knochenersatzmaterialien und Implantaten vorsieht. Diese antibakteriellen Beschichtungen sollen sowohl als Schutz gegen bakteriellen Befall als auch der Einleitung einer lokalen Antibiotikatherapie dienen.⁴⁴ Weiterhin belegen frühere Studien, dass die Entwicklung eines Antibiotikums gegen die Karies

verursachenden Bakterien aufgrund der fehlenden Zugänglichkeit zum Biofilm und der kariösen Zahnhartsubstanz keinen Erfolg zeigte.⁴⁵ In neueren Forschungsansätzen wurde ein Antibiotikum entwickelt, das über einen Mechanismus, der als STAMP (specifically targeted antimicrobial peptides) bezeichnet wird, in den Biofilm eindringen und selektiv *Streptococcus mutans*-Bakterien abtöten kann.⁴⁶ Eine weitere Veröffentlichung bestätigt die Wirksamkeit in einer Mundspüllösung in vivo. Weitere klinische Studien, die die Anwendbarkeit dieser Methode zeigen könnten, sollen folgen.⁴⁷

In der Vergangenheit wurde zudem Forschungen im Bereich der Impfung gegen *Streptococcus mutans* und somit gegen den wahrscheinlichen Haupterreger der Karies, der meist von Eltern auf ihre Kindern übertragen wird, unternommen. Erfolge der Impftherapie gegen Karies wurden in Tierversuchen sowohl bei der aktiven als auch bei der passiven Immunisierung durch die Injektion von *Streptococcus mutans*-Bakterienzellen erzielt. Probleme ergaben sich allerdings bei der Übertragung auf den menschlichen Körper. Es traten Kreuzreaktionen auf, die als Folge der Bildung von Serumantikörpern gegen das Herzmuskelgewebe nach intramuskulärer Injektion von *Streptococcus mutans*-Bakterienzellen eintraten.^{48,49}

Liegt bereits eine Karies an der Zahnhartsubstanz vor, muss diese exkaviert werden und eine Füllung der entstandenen Kavität erfolgen. Hier wird bereits beim Legen darauf geachtet, die Bakterienzahl so gering wie möglich zu halten, bestenfalls erfolgt die Behandlung unter Kofferdam.⁵⁰ Zur Reduktion der Bakterien nach Kariesexkavation trägt die Kavitätenreinigung bei, beispielsweise durch Chlorhexidinglukonat (CHX 0,2%). Im Rahmen einer Wurzelkanalbehandlung, bei der das Pulpagewebe eines Zahnes nicht mehr zu erhalten ist, kommen zahlreiche antimikrobiell wirksame Substanzen zum Einsatz. Eine Aufbereitung der Kanäle erfolgt mittels Instrumenten und Spülungen, um sowohl Dentinspäne zu entfernen als auch zur Desinfektion sowie Entfernung des Smear Layers. Spüllösungen können beispielsweise Chlorhexidinglukonat (CHX), Natriumhypochlorid (NaOCl) oder Wasserstoffperoxid (H₂O₂) sein. Zu den medikamentösen Einlagen zwischen den einzelnen Sitzungen einer Wurzelkanalbehandlung sind Ledermix (Cortison

und Antibiotikum) oder $\text{Ca}(\text{OH})_2$ zu zählen.⁵¹ Auch Ultraschallaktivierung oder Laserstrahlen sollen zur Bakterienreduktion im Wurzelkanal beitragen.⁵²

2.3 Etablierte antimikrobiell wirksame Füllungsmaterialien

Besonders Glasionomerezemente erfüllen sowohl die Anforderungen an einen antimikrobiellen Schutz vor Kariesbakterien als auch an die Biokompatibilität. Das Pulver weist 80-90 Masseprozent an Glaspartikeln aus einem Calciumaluminatglas auf, dem weitere Zusätze beigemischt werden. Die flüssige Phase wiederum besteht größtenteils aus Polyacrylsäure. Sie erweisen sich auch nach dem Aushärten als dauerhaft wirksam. Die Wirkung beruht auf der Freisetzung von Fluoriden (siehe 2.4). Problematisch sind allerdings Werkstoffeigenschaften bei Kaubelastung sowie Verarbeitungsprobleme. Deshalb wird versucht, Komposite oder Haftvermittler herzustellen, die ebenfalls antimikrobielle Eigenschaften aufweisen.^{53,54}

Zinkoxidphosphat-Zemente finden meist Anwendung beim Zementieren von Kronen- und Brückenversorgungen oder als Unterfüllungszement. Das Zementpulver besteht zu 80-90 Gewichtsprozent aus Zinkoxid und Zusätzen wie Magnesiumoxid, Siliziumoxid und Calciumfluorid. Zum Anmischen des Zements benötigt man weiterhin eine wässrige Lösung von Orthophosphorsäure. Durch weitere Zusätze von Aluminium und Zink wird die Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt. Die antimikrobielle Wirkung ist auf das Zinkoxid zurückzuführen. Eine Studie zeigte, dass Zinkoxidphosphatzement die größte antibakterielle Wirkung von verschiedenen getesteten Dentalzementen in Bezug auf *Streptococcus mutans* aufwies.^{55,56}

Zinkoxid-Eugenol ist etabliert als Bestandteil einiger zahnärztlicher Werkstoffe wie Zementen oder provisorischen Füllungsmaterialien. Die antibakterielle Wirkung lässt allerdings nach einigen Tagen wieder nach.^{57,58}

Calciumhydroxid ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) findet im zahnmedizinischen Bereich häufig Anwendung, um eine Alkalisierung des präparierten Dentins zu erreichen. Es dissoziiert in geringem Maße und wirkt alkalisch. Somit kommt ein antimikrobieller Effekt zustande, der jedoch mit Austrocknung verloren geht. Die

Darreichungsformen sind vor allem Pasten, Zemente und Liner, die an pulpanahen Stellen einer Kavität im Sinne einer indirekten Überkappung oder auch zum Zwecke einer direkten Überkappung nach Pulpeneröffnung im kariesfreien Dentin eingebracht werden können. Sie regen die Tertiärdentinbildung, das so genannte Bridging an. Als alleinige Unterfüllung, beispielsweise unter Amalgam, eignet sich Calciumhydroxid nicht, es muss von einem druck- und säurefesten Material überdeckt werden. Weiterhin wird Calciumhydroxid auch in Kunststoffpräparate eingebracht. Hier ist die Calcium- und Hydroxylionenabgabe vor allem im Gegensatz zu Pasten herabgesetzt. Der antimikrobielle Effekt beruht auch hier auf dem hohen pH-Wert und der Fähigkeit, Hydroxylionen abzugeben.⁵⁹ Calciumphosphate werden in Form von Tricalciumphosphat (TCP) in Zementen als Knochenersatzmaterial genutzt. Es wurde bereits gezeigt, dass Calciumkalium- und Calciumnatrium-Phosphat einen besseren antimikrobiellen Effekt auf Bakterien aufweist als Calciumhydroxid.²²

Bioaktive Gläser und Glaskeramiken können eine Bindung an Hart- und Weichgewebe eingehen und bewirken die Bildung einer knochenartigen Kalziumphosphatschicht an den betreffenden Oberflächen. Sie werden in der Zahnheilkunde im Bereich der Implantologie bzw. Chirurgie als alloplastisches Knochenersatzmaterial eingesetzt.^{60,61} Unter Kontakt zu Körperflüssigkeiten werden bei bioaktiven Gläsern Alkali- und Siliziumionen freigesetzt, was eine Erhöhung des pH-Werts und osmotischen Drucks bewirkt. Außerdem wurde eine antibakterielle Wirkung auf einige Bakterien, unter anderem *Streptococcus mutans*, nachgewiesen.⁶²

2.4 Antimikrobiell wirksame Komposite

Diese Arbeit befasst sich im Speziellen mit antibakteriellen Eigenschaften von Kompositen als Füllungsmaterialien. Bevor das eigentliche Füllmaterial in die Kavität eingebracht werden kann, muss diese vorbereitet werden. Zu den Maßnahmen beim Legen einer Füllung gehören die Konditionierung der Schmelz- und der Dentinfläche und das Priming und Bonding der Dentinfläche. Es gibt zahlreiche Systeme, die beispielsweise in diesen einzelnen Schritten ablaufen oder aber Ätzen, Primen und Bonden in einem Produkt oder zwei Produkten zusammenführen. Die Aushärtung des Komposits erfolgt meist über eine Halogenlichtgerät, das zur Polymerisation anregt.¹⁶ Zur Herstellung von anti-bakteriellen Kompositen gibt es zahlreiche Möglichkeiten, von denen hier nur einige genauer beschrieben werden sollen. Wie bereits erwähnt, können entweder eingebrachte Substanzen nach und nach freigesetzt werden oder dauerhaft an die Matrix gebunden ihre Wirkung entfalten.

Zu den Möglichkeiten der freigesetzten Substanzen zählen unter anderem Fluoride, die entweder im Komposit selbst und auch im Bonding eingebracht werden können. Sie sind die Salze der Fluorwasserstoffsäure (HF), die eine fluorapatitähnliche Schicht an der Zahnoberfläche bilden sollen. Fluoride können anstelle von Apatit und Hydroxid in die Zahnhartsubstanz eingebaut werden, es entsteht Fluorapatit, welcher geringer löslich ist. Man spricht von Remineralisierung, da die durch Säuren gelösten Apatite wieder ausgefällt werden. Zudem hat Fluorid eine bakteriostatische Wirkung durch Hemmung auf das glykolytische Enzym Enolase.^{63,64} Heutige fluoridhaltige Komposite werden beispielsweise mit Ytterbium- (YbF_3) oder Yttriumfluorid (YF_3) versetzt. Die Fluoride werden in die Polymermatrix integriert und können in geringen Mengen freigesetzt werden, um so der Demineralisierung entgegen zu wirken.⁶⁵ Ob allerdings durch diesen Effekt auch eine Sekundärkaries verhindert werden kann, bleibt fraglich.^{65,66}

Auch bei Glutaraldehyd, einem Bestandteil von einigen Dentinbondingsystemen und Desensitizern, konnte ein antibakterieller Effekt nachgewiesen werden. Glutaraldehyd reduziert zum einen die Demineralisation des Dentins, zum

anderen zeigten sich in Versuchen ein antimikrobieller Effekt, der vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass die Bakterien durch das freigesetzte Glutaraldehyd abgetötet wurden.^{67,68} Auch wurde versucht, CHX als antimikrobielle Substanz in das Komposit einzubringen. Wie sich zeigte, hatte dies zwar keinen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften, eine Langzeitwirkung (länger als ein Jahr) trat aber nicht ein.⁶⁹

Silber wird bereits vielfach als direkter Bestandteil in Medizinprodukten und als Beschichtung genutzt.⁷⁰ Eine weitere Möglichkeit ist, antibakteriell wirkende Ag-Ionen in die Siliciumfüller eines Komposits einzubringen, was eine toxische Wirkung auf Bakterien hat. Auch gegen *S. mutans* konnte eine antimikrobielle Wirkung beobachtet werden.⁷¹ Als Füllungsmaterial hat Silber allerdings einen ungünstigen Einfluss auf die Farbe des Komposits, da durch photochemisch induzierte Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber eine Dunkelfärbung des Werkstoffs eintritt.¹⁸ Des Weiteren wurden bereits Komposite mit Calciumphosphat hergestellt, um zur Remineralisierung der Zahnhartsubstanz beizutragen, indem sie Calcium- und Phosphationen freisetzen. Allerdings besitzen sie eine geringere Festigkeit und Stabilität als herkömmliches Komposit und müssen somit in diesen Eigenschaften noch verbessert werden.⁷²

Zur Möglichkeit, einen antimikrobiellen Werkstoff fest an die Polymermatrix zu binden, zählt das Einbringen von Methacrylyloxydodecylpyridinbromid (MDPB). Es ist ein Syntheseprodukt aus Dodecylpyridinbromid und einer Methacryl-Gruppe und ist in der Polymermatrix des Komposits kovalent gebunden. Die Funktion beruht auf der positiv geladenen Pyridiniumgruppe des MDPB-Monomers. Hierdurch werden die negativ geladenen Zellstrukturen der Bakterien angezogen, wodurch das elektrische Gleichgewicht der Zellmembran gestört wird und das Bakterium abstirbt. Es wurde gezeigt, dass MDPB im Agardiffusionstest das Wachstum von *Streptococcus mutans* hemmt. Dabei hatte es keine Auswirkung auf die Polymerisation oder mechanische Eigenschaften des Komposits.^{73,74}

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Vorgehensweise

Folgende Tabelle (**Tabelle 3**) soll einen Überblick über die experimentelle Vorgehensweise zeigen. Hier werden die getesteten Kriterien, die hierzu angewandten Eignungsprüfungen und verwendeten Geräte dargestellt.

Kriterium	Eignungsprüfung	Geräte
Oberflächenmorphologie	Rasterelektronenmikroskopie	Rasterelektronenmikroskop DSM 940, Zeiss, Oberkochen
Antibakterielle Wirkung	Vorversuch: Agardiffusionstest Hauptversuch: WST-1-Test	-- Elisa-Reader Infinite, Tecan, Crailsheim
pH-Wert	pH-Wertbestimmung aus umgebendem Medium	pH- Meter, inoLab WTW, Weilheim
Konversionsrate	Raman-Spektroskopie	Raman-Mikroskop RM 1000, Renishaw, Pliezhausen
Biegefestigkeit	3-Punkt-Biegefestigkeitstest	Mechanische Universalprüfmaschine Zwick Z010, Zwick Roell, Ulm
Röntgenopazität	Röntgenopazitätstest mittels Aluminiumstufen-Vergleich	Dentalröntgengerät Heliodent DS, Sirona, Bensheim
Demineralisation/ Remineralisation	Demineralisations- und Remineralisationstest (TWIX-Test)	Röntgengenerator PW 1729, Philips, Hamburg

Tabelle 3 Prüfkriterien, Art der Prüfung und verwendeten Geräten

Die Literatursuche erfolgte mittels der Datenbanken pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) und Science Direct (<http://www.sciencedirect.com>). Weiterhin wurde zur gezielten Suche nach Volltexten Google Scholar genutzt (<http://scholar.google.de>). Auch zahnmedizinische und medizinische Lehrbücher wurden für Begriffserklärungen

oder die Beschreibung einfacher Sachverhalte, wie beispielsweise das Legen einer Füllung, verwendet und sind im Literaturverzeichnis angegeben.

3.2 Präparative Arbeiten

Die Synthese der Calciumalkaliphosphate CaKPO_4 , CaNaPO_4 oder $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ erfolgte durch Sinterung der jeweiligen Pulvermischungen (siehe **Tabelle 4**) mit anschließender Mahlung, um durch mechanische Aktivierung eine Erhöhung der Löslichkeit und Reaktivität zu bewirken.⁷⁵ Die jeweiligen Pulver wurden in 300 ml Isopropanol suspendiert und eine Stunde gerührt. Hierauf wurde die Suspension abfiltriert und der entstandene Filterkuchen getrocknet. Anschließend erfolgte die Sinterung in Aluminiumoxid-Tiegeln bei 1050 °C für 24 Stunden. Der Filterkuchen musste vollständig auskühlen. Es folgte zunächst die Zerkleinerung mit dem Mörser und dann eine Siebung auf 355 µm. Die Mahlung für die mechanische Aktivierung der Calciumalkaliphosphate wurde für 24 Stunden mit einer Planetenkugelmühle (PM 400, Retsch, Haan) durchgeführt. In Achatmahlbechern und mittels 200 Kugeln mit dem Durchmesser 10 mm wurde mit einer Geschwindigkeit von 250 U/min in eine Richtung gemahlen. Dies erfolgte als Nassmahlung. Hierzu wurden 75 g des jeweiligen Calciumalkaliphosphates mit 125ml Ethanol (Sigma-Aldrich Chemie, Sternheim) verwendet. Die Trocknung erfolgte bei 50 °C im Vakuum-Trockenofen (Heraeus instruments GmbH, Hanau) für 8h.

Zur Oberflächensilanisierung der Füllstoffe wurden 10 g Calciumalkaliphosphat mit 1 ml Silan A 174 – Haftvermittler (Merck, Darmstadt) ($\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{Si}_i$), einem Tropfen destilliertem Wasser (ca. 0,05 ml) und 50 ml Isopropanol (Merck, Darmstadt) verrührt und der Feststoff mit Hilfe einer Filternutsche (Porosität 4 aus Borosilikatglas 3.3, 125 ml, VWR International, Bruchsal) abfiltriert.

	CaHPO ₄	Na ₂ CO ₃	K ₂ CO ₃
CaKPO ₄	2.00 mol (272.1 g)	-	1.00 mol (100.09 g)
CaNaPO ₄	2.00 mol (272.1 g)	1.00 mol (100.09 g)	-
Ca ₂ KNa(PO ₄) ₂	2.00 mol (272.1 g)	0.5 mol (50.45 g)	0.5 mol (50.45 g)

Tabelle 4 Zusammensetzung der verwendeten Calciumalkaliphosphate

3.2.1 Herstellung der Prüfkörper

Die Prüfkörper werden als Rundproben mit einem Durchmesser von 15,5 mm ± 0,1 und einer Höhe von 2 mm ± 0,1 (passend für eine 24-Well-Zellkulturplatte) angefertigt.

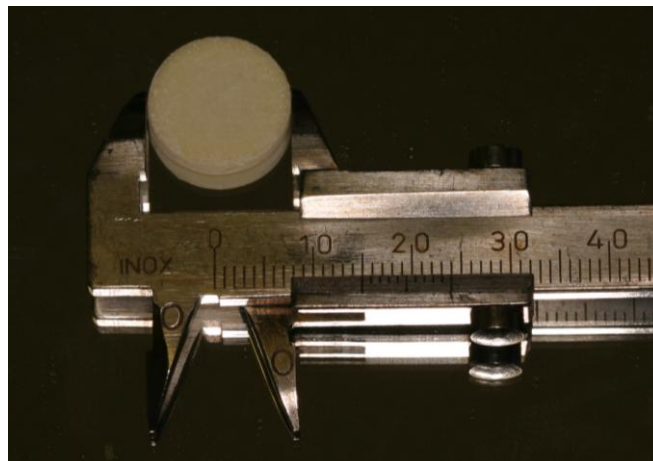


Abbildung 1 Prüfkörper aus Calciumalkaliphosphat dotiertem Komposit für den Hauptversuch

Benötigt wurden für einen Versuch mit einer Bakterienart jeweils 6 Prüfkörper mit Zusatz von Calciumalkaliphosphaten als Probe und jeweils 3 Prüfkörper ohne Zusatz als Referenz. Zur Formgebung wurde eine eigens dafür hergestellte Silikonform aus Dublisil (additionsvernetzendes Vinyl-Polysiloxan) Basis und Katalysator im Verhältnis 1:1 verwendet (Dreve Dentamid, Unna), um Prüfkörper von definierter und reproduzierbarer Größe zu erhalten. Als Modell

für die Formgebung diente eine Titan-Scheibe der entsprechenden Größe. Weiterhin wurde für die Herstellung eine digitale Waage mit einer Ablesegenauigkeit von 0,01 verwendet (Typ Sartorius 4, Bicerba, Würzburg).

Für die Vorversuche wurden die Probe-Prüfkörper mit zuvor 24 h gemahlenem CaKPO_4 , CaNaPO_4 oder $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ im Mischungsverhältnis 1:1 (PMMA:Calciumalkaliphosphat) hergestellt. Als PMMA-Modellkunststoff wurde Technovit 4071 - Pulver und die zugehörige flüssige Phase (Haereus Kulzer, Wehrheim) im Verhältnis 2:1 verwendet. Die Prüfkörper härteten durch eine chemisch induzierte Autopolymerisation vollständig aus.

Im Hauptversuch wurden Komposit-Prüfkörper ebenfalls mit dem Zusatz von CaKPO_4 , CaNaPO_4 oder $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ hergestellt. Das Komposit wiederum wurde selbst hergestellt und bestand aus BisGMA (Bisphenol A glycerate(1 glycerol/phenol)-dimethacrylate) und TEGDMA (Triethylenglykoldimethacrylat 95%) (jeweils Sigma-Aldrich Chemie, Sternheim), einem Aktivator, einem Initiator und einem Füllkörperanteil von 50 Gew.%. Zunächst wurden BisGMA und TEGDMA im Verhältnis 2:1 miteinander vermengt. Danach wurde 1 Gew.-% des tertiären Amins N,N-Dimethyl-p-toluidin 99% als Aktivator und 1 Gew.-% Campherchinon als Initiator (jeweils Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim) hinzugefügt, um das Komposit zu aktivieren. Als Füllkörper wurde 25 % Cristobalitmehl Silbond 6000 MST (Bassermann Minerals, Mannheim) verwendet und als Zusatz weitere 25 % CaKPO_4 , CaNaPO_4 oder $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$, welches zuvor silanisiert wurde.

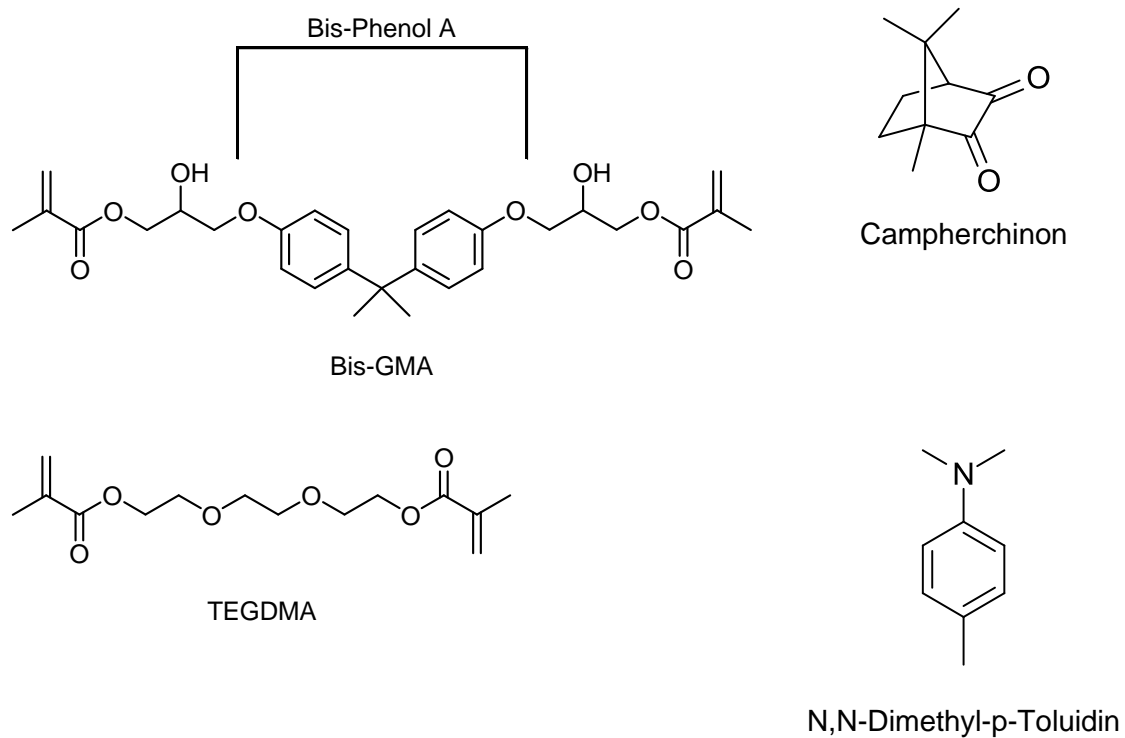


Abbildung 2 Chemische Formeln von Bis-GMA, TEGDMA, Campherchinon und N,N-Dimethyl-p-Toluidin

Die radikalische Polymerisation und somit Aushärtung erfolgte durch Bestrahlung mit einem Halogenlichtgerät der Marke Translux CL (Kopp, Bruckköbel) für 4x40 Sekunden auf beiden Seiten. Im Anschluss wurden die Prüfkörper mit Hilfe eines feinkörnigen Schleifpapiers (Struers, Willich, Körnung 600) beschliffen, um die Sauerstoffinhibitionsschicht, die auf der Oberfläche entsteht, zu entfernen. Die Referenzprüfkörper wurden für die Vorversuche ebenfalls aus PMMA und Monomer im Verhältnis 2:1 hergestellt. Im Hauptversuch wurde der Mischung aus BisGMA und TEGDMA Cristobalit im Verhältnis 1:1 beigemischt und mittels Halogenlichtgerät ausgehärtet. Die Prüfkörper für den Test der Biegefestigkeit hatten die Maße $(2 \pm 0,1)$ mm x $(2 \pm 0,1)$ mm x (25 ± 2) mm und wurden in einer bereits vorhandenen Stahlform gefertigt.

3.3 Oberflächenanalyse mittels Rasterelektronenmikroskop

Mittels Rasterelektronenmikroskop (DSM 940, Zeiss, Oberkochen) wurden die reinen Oberflächenstrukturen der verschiedenen Prüfkörper repräsentativ analysiert. Hierzu wurden die Prüfkörper mit einer dünnen Goldschicht bedampft, um eine Leitfähigkeit herzustellen, anschließend mikroskopiert und dokumentiert. Mit einer Beschleunigungsspannung von 5 kV und einer 500-, 1000- und 3000-fachen Vergrößerung konnten die Präparate dargestellt werden.

3.4 Analyse des Bakterienwachstums auf den Oberflächen

3.4.1 Bakterien, Puffer und Medien

Die verwendeten Bakterienkulturen waren *Klebsiella pneumoniae* (strain 3091)⁷⁶, *Staphylococcus aureus* (strain RM 4220)⁷⁷, *Staphylococcus epidermidis* (strain RP62A, ATCC 35984), *Streptococcus salivarius* (strain 259, DSM 20259), *Streptococcus mutans* (DSM 20523) und ein Plaquemix (Patientenprobe, nicht näher bestimmt), die in LB-Nährmedium herangezüchtet wurden.

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von der Firma Merck AG (Darmstadt) bezogen. Das Reinstwasser wurde aus der laboreigenen Wasseraufbereitungsanlage (USF PURELAB PLUS) entnommen.

Das LB-Nährmedium wurde aus 2 g NaCl, 4 g Trypton/Pepton, 2 g Yeast und 400 ml Reinstwasser hergestellt und bei 121°C für 20 min autoklaviert. Danach wurde es bis zur Benutzung im Kühlraum bei 4 °C gelagert. Der LB-Agar wurde aus 2 g NaCl, 4 g Pepton/Trypton, 2 g Yeast, 6 g granuliertem Agar und 400 ml Reinstwasser hergestellt und bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Danach wurde es in Petrischalen gegossen und bis zur Benutzung im Kühlraum gelagert.

Der PBS-Puffer wurde aus 8,0 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 2,8 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 0,2 g KCl und 1000 ml Reinstwasser hergestellt und bei 121°C für 20 min autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Das Proliferations-Reagenz WST-1 enthält den Farbstoff WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolium]-1,3 Benzendisulfonat), der nach Angaben des Herstellers (Boehringer, Mannheim) angesetzt wurde. WST-1 ist ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz, das der Bestimmung der Zellaktivität dient. Es wird durch das Enzym Succinatdehydrogenase zu farbigem Formazan umgewandelt und stellt somit einen Marker für die Stoffwechselaktivität von Zellen dar. Die Absorption steht in einem linearen Verhältnis zur Anzahl der vorhandenen vitalen Zellen. Somit kann das WST-1-Reagenz als Nachweis für die Bakterien auf den antimikrobiellen Prüfkörpern dienen, was bereits beschrieben wurde.²³

3.4.2 Vorversuch: Agardiffusionstest

In Vorversuch wurde das Prinzip des Agardiffusionstests angewandt. Die Abmessungen der Prüfkörper betragen hier allerdings im Durchmesser 10 mm \pm 0,1 und in der Höhe von 5 mm \pm 0,1. Sie bestanden aus Technovit (PMMA) und CaKPO₄. Die Nährmedienherstellung erfolgte auf dieselbe Art wie im Hauptversuch, allerdings wurden hier, wie bereits beschrieben, Agarkulturplatten angelegt. Nach dem Autoklavieren und kurzem Auskühlen auf ca. 50 °C wurde die Lösung unter einer sterilen Werkbank in sterile Petrischalen (100 mm Durchmesser) gefüllt, so dass sich in jeder Schale etwa 20 ml der Agarlösung befanden. Diese Lösung härtete für etwa 12 Stunden aus und wurden im Kühlraum bei 4 °C gelagert. Zu Beginn jeder Versuchsreihe wurde das Nährmedium mit der jeweiligen Bakterienkultur inokuliert, die Keimzahl der Übernachtskultur betrug ca. 1×10^8 . Dazu wurden jeweils 2 ml der Nährlösungen mit 10 μ l der entsprechenden Bakterienkultur versetzt. Dieser Arbeitsschritt fand aufgrund der geforderten Keimfreiheit unter einer sterilen Werkbank statt. Als Hilfsmittel diente eine Eppendorf – Pipette (Eppendorf, Hamburg). Die Bakterienkulturen wurden nun auf die Agarfläche pipettiert und jeweils ca. 10 sterile Glaskügelchen (1,5 mm Durchmesser) verwendet, um durch Schwenken der Schale eine gleichmäßige Verteilung der Keime auf der Agaroberfläche zu bewirken. Danach wurden Prüfkörper, Referenzkörper und eine weitere

Referenz aus Metall (Edelstahl, Durchmesser 15,5 mm, Höhe 1 mm, mit gestanztem Loch, autoklaviert) auf der Schale verteilt und im Brutschrank bei 37 °C 24 h gelagert. Anschließend wurde der im gewachsenen Bakterienrasen vorhandene Hemmhof gemessen.

3.4.3 Hauptversuch: Beimpfen der Prüfkörper mit Bakterienkulturen

Zu Beginn jeder Versuchsreihe wurde aus einer Gefrierschrankkultur (aus den Beständen der Abteilung der Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde, siehe 3.4.1), die aus 900 µl Bakterienkultur und 100 µl sterilem Glycerin bestand, unter sterilen Verhältnissen 30 µl der Bakterienkultur in 8 ml LB-Medium gegeben. Dies wurde 24 h bei 37 °C auf einem Schüttler bei einer Rotorgeschwindigkeit von 190 rpm im Brutschrank ohne CO₂-Begasung gelagert, um so eine ausreichende Menge Bakteriensuspension für die Experimente zu erhalten.

Nach 24 h wurden 30 ml LB mit 1 ml aus der Kultur vom Vortag vermischt und für 2 h auf einem Schüttler im Brutschrank gelagert. Die optische Dichte (OD) betrug bei 600nm ca. 0,4. Diese Menge war ausreichend für eine 24-Well-Platte. Die Prüfkörper wurden folgendermaßen in den Vertiefungen der Platte angeordnet: 6 Prüfkörper mit Zusatz von Calciumalkaliphosphaten für die Probe, 3 Negativkontrollen (Polystyrol) und 3 Prüfkörper ohne Zusatz von Calciumalkaliphosphaten als Referenz (**Abb. 3**).

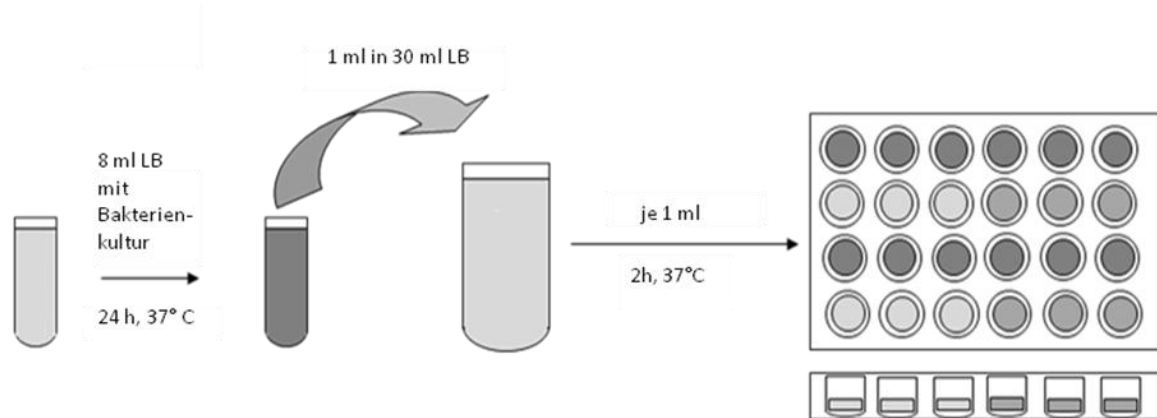


Abbildung 3 Vorgehen beim WST-1-Test mit Anordnung der Prüfkörper in der 24-Well Platte mit einer Bakterienart, in Reihe 1 und 3: Proben, in Reihe 2 und 4: Polystyrol als Negativkontrolle (Vertiefung 1-3) und Referenzprüfkörper (Vertiefung 4-6)

Zu diesen wurde jeweils 1 ml der Bakteriensuspension pipettiert. Die Well-Platte wurde 24 h im Brutschrank, diesmal jedoch nicht auf dem Schüttler, inkubiert. Nun erfolgte die Auswertung des Versuchs mittels WST-1 Reagens (siehe 3.4.4). Hierzu wurde die Bakterienkultur von den Prüfkörpern abgesaugt, mit jeweils 1 ml PBS einmal gewaschen und wiederum abgesaugt. Danach wurden jeweils 0,5 ml einer Lösung aus WST und PBS (1:100) auf die Prüfkörper pipettiert und für 1 h ohne Schüttler in den Brutschrank gestellt. Die Flüssigkeit wurde auf eine 96-Well-Platte pipettiert: Es wurden 200 µl der PBS-WST-Lösung als Leerwert benötigt. Von den Prüfkörpern und Kontrollwerten wurden jeweils 2x 200 µl entnommen und auf die 96-Well-Platte pipettiert. Die so vorbereitete Platte konnte mit Hilfe eines Elisa-Readers (Tecan, Crailsheim) und des zugehörigen Computerprogramms ausgewertet werden.

3.4.4 WST-1 Zellaktivitätstest

Die Auswertung des Versuchs erfolgte über den so genannten Zellaktivitätstest mittels des Farbstoffes WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim). Dieser beruht auf der Umsetzung von WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolium]-1,3-Benzendisulfonat) durch die Succinatdehydrogenase und bewirkt einen Farbumschlag zu Formazan. Die Intensität der Färbung wurde im

Elisa-Reader (Tecan, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Je mehr vitale Zellen vorhanden sind, desto stärker ist der Farbumsatz bzw. desto höher ist die Absorption. Diese ist proportional zur Stoffwechselaktivität der Zellen. Zur Durchführung der Tests wurden zunächst aus jeder Kavität der 24-Well-Platten das Medium abgezogen und die verbleibenden Mediumreste durch einmaliges Waschen mit jeweils 1 ml PBS-Puffer entfernt. Dann wurden 500 µl entsprechendes Medium und 50 µl eines WST-1- PBS-Gemischs (WST:PBS im Verhältnis 1:100) zupipettiert und der Ansatz bei 37 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurden je 2 x 200 µl des Gemisches aus jedem Well in 2 Wells einer 96-Well-Platte für die Doppelbestimmung überpipettiert. Die Messwerte wurden anhand des Farbumschlags im ELISA-Reader mit einem Messfilter von 450 nm und einem Referenzfilter von 690 nm ermittelt. Als Leerwert bei diesen Messungen diente ein Gemisch aus 500 µl Medium und 50 µl des Proliferations-Reagenz WST-1. Als Negativkontrolle diente das Zellkultur-Polystyrol der Wellplatte (Nunc A/S, Roskilde). Diese Referenzoberfläche wird direkt als Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen verwendet, welche gebrauchsfertig geliefert wird. Auch wurden 2 Prüfkörper unter den gleichen Voraussetzungen ohne Bakterienkultur auf einen eventuellen Farbumschlag getestet, um auszuschließen, dass ein Einfluss durch die Polymere bzw. deren Füllstoffe stattfand. Es kam, wie erwartet, zu keinem Farbumschlag. Die Ergebnisse werden mittels Elisa-Reader ausgewertet und mit Excel und Origin weiterverarbeitet und graphisch dargestellt.

3.5 pH-Wertbestimmung bei Prüfkörpern in LB-Medium

Für die pH-Wertbestimmung wurden die Prüfkörper in LB-Medium (Herstellung wie 3.1.2) eingelegt. Jeweils 2 Prüfkörper mit Zusatz von CaKPO_4 , CaNaPO_4 und $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ wurden hierzu unter sterilen Verhältnissen in jeweils 1 ml LB-Medium gelagert. Über einen Zeitraum von 9 Tagen wurde täglich zum gleichen Zeitpunkt die Überstände entnommen, die pH-Wert gemessen und

neues Medium nachgefüllt. Die Entnahme der Werte erfolgte mittels des pH-Meters inoLab (WTW, Weilheim).

3.6 Bestimmung der Konversionsrate durch Raman-Spektroskopie

Die Konversionsrate der experimentell hergestellten Komposite wurde mittels Raman Spektroskopie (RM 1000, Renishaw, Pliezhausen) ermittelt. Die Ramanspektroskopie dient der Analyse von Materialeigenschaften. Jeweils drei Spektren wurden im Bereich zwischen $1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} aufgenommen. Die Spektren gaben Aufschluss über die Bindungsstrukturen.

Der Konversionsgrad der polymerisierten und unpolymerisierten Proben wurde anhand der Flächen der vinylischen (1640 cm^{-1}) und aromatischen (1608 cm^{-1}) Peaks der C=C Doppelbindungen bestimmt und entsprechend folgender Formel errechnet: ⁷⁸

$$\text{Konversionsgrad (DP)} = (1 - A^{\text{Pvinyl}} / A^{\text{Paromat}} * A^{\text{Earomat}} / A^{\text{Evinyl}}) * 100\%$$

A^{E} und A^{P} sind die Flächen der C=C Peaks vor und nach der Polymerisation

3.7 Biegefestigkeitsversuch

Die Biegefestigkeit wurde in Anlehnung an die Norm DIN EN ISO 4049 ermittelt. 5 Probenkörper der Dimension $(2 \pm 0,1)\text{ mm} \times (2 \pm 0,1)\text{ mm} \times (25 \pm 2)\text{ mm}$ wurden mit Hilfe einer Edelstahlform hergestellt. Unter Lichtausschluss wurden die Probenkörper dann bis zum Test wieder im Wasserbad gelagert. 24 Stunden nach der Herstellung wurden die Höhe und Breite der Körper bestimmt ($\pm 0,01\text{ mm}$) und die 3-Punkt- Biegefestigkeit wurde mit einer Zwick Roell Z010 (Vorschubgeschwindigkeit: $(0,75 \pm 0,25)\text{ mm/min}$, Belastungsgeschwindigkeit: $(50 \pm 16)\text{ N/min}$) untersucht, wobei bis zum Bruch belastet wurde.

Die Biegefestigkeit wird in Megapascal nach folgender Gleichung errechnet:

$$\sigma = 3 F l / 2 b h^2$$

- F max. auf den Probenkörper ausgeübte Kraft, N
- l Abstand zwischen den Auflagern ($\pm 0,01$ mm), mm
- b Breite des Probenkörpers, mm
- h Höhe des Probenkörpers, mm

Beim Biegefestigkeitsversuch kann man sowohl plastische als auch elastische Bereiche bestimmen. Auch bei einer Biegung gibt es einen proportionalen Bereich, in dem der Probekörper sich wieder rückstellt, wenn man die einwirkende Kraft entzieht. Die Steigung der Spannungs-Dehnungskurve in diesem Bereich wird als Elastizitätsmodul (E-Modul) bezeichnet.

Der E-Modul kann ebenfalls in Megapascal (MPa) nach folgender Formel berechnet werden:

$$E = F l^3 / 4 h^3 b f$$

- F max. auf den Probenkörper ausgeübte Kraft, N
- l Abstand zwischen den Auflagern ($\pm 0,01$ mm), mm
- b Breite des Probenkörpers, mm
- h Höhe des Probenkörpers, mm
- f Höhe der Durchbiegung, mm

3.8 Röntgenopazitätstest

Die Röntgenopazität wurde nach DIN EN ISO 4049 bestimmt. Es wurden Prüfkörper mit einem Durchmesser von $(15 \pm 0,1)$ mm x $(1 \pm 0,1)$ mm hergestellt. Für den Test wurde eine Röntgentreppe aus Aluminium, auch Stufenkeil genannt, genutzt. Diese ist 20 mm breit und besteht aus 10 Stufen mit einer Dicke von 0,5 bis 5 mm, die in 0,5 mm - Schritten ansteigen. Sie muss einen Reinheitsgrad von 98 % besitzen, weniger als 0,1% Kupfer- und weniger

als 1,0% Eisenanteil haben, damit sie mit Zahnschmelz verglichen werden kann.

Die verschiedenen Prüfkörper waren auch in diesem Test selbst hergestelltes Komposit, Komposit mit Zusatz von CaKPO_4 , CaNaPO_4 und $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_2)_4$. Diese wurden jeweils auf einem zahnärztlichen Film (Kodak insight 3,1x 4,1 cm) zusammen mit der Röntgentreppe angeordnet. Mit einem Bleiblech als Unterlage wurde dieses bei einer Beschleunigungsspannung von 65 +/- 5 kV und einem Objekt-Film-Abstand von 400 mm mit einem Dentalröntengerät (Heliodent DS, Sirona) belichtet. Ein Schwärzungsgrad zwischen 1,5 und 2 sollte aufzuweisen sein. Die Auswertung erfolgte allerdings abweichend von der Vorschrift statt in einem Fotodensidosimeter mit der Computer-Software ImageJ, mit dem die Grauwerte bestimmt und verglichen werden konnten.

3.9 Demineralisations- und Remineralisationstest⁷⁹

Um die Demineralisations- und Remineralisationsfähigkeit der Prüfkörper zu testen, wurde künstlicher Schmelz benötigt, der dem menschlichen entspricht. Die Prüfkörper wurden aus Hydroxylapatit mit einer Dichte von 1,65 g/cm hergestellt. Diese ist vergleichbar mit der Dichte von demineralisiertem oder auch kariösem menschlichen Schmelz. Für einen Testkörper wurden 0,458 g Pulver (Analysewaage: Sartorius, Typ MC1 RC 210P, Göttingen) von Tricalciumphosphat/ Hydroxylapatit (Type C 13-08 Budenheim, Budenheim) in eine Metallform eingebracht und unter einem Druck von 17 bar mittels einer hydraulischen Presse gepresst. Danach wurden die Testkörper für 90 Minuten auf 900 °C im Ofen erhitzt. Die Tabletten wurden bis zur Weiterverarbeitung im Exsikkator gelagert. Nun wurde für einen besseren Verbund zum Komposit ein Bonding (Optibond FL, Kerr Hawe, Ratstatt) aufgebracht und für 40 s mittels Polymerisationslichtgerät (Translux CL, Kopp GmbH, Bruckköbel) gehärtet. Hierauf wurden die unterschiedlichen Komposite aufgebracht und ebenfalls lichtgehärtet. Zuletzt wurden die Prüfkörper mittels Schleifpapier (Struers, Willich, Körnung 600) bearbeitet, bis sie die erforderliche Höhe von 0,8 mm erreichten. Auch hier wurde exemplarisch zur Oberflächenanalyse REM-

Aufnahmen vor und nach der Demineralisation bei einer 500-fachen Vergrößerung gemacht (Vorgehen wie 3.3).



Abbildung 4 Prüfkörper aus Hydroxylapatit mit Kompositbeschichtung

Für diesen Test, der auch TWIX-Test genannt wird, wurden eine Remineralisationslösung und eine Demineralisationslösung benötigt. Die Remineralisationslösung hatte einen pH-Wert von 6,50, die Demineralisationslösung einen pH-Wert von 3,50. Die Remineralisationslösung wurde aus 10 ml NaH_2PO_4 (Natriumphosphat), 0,6166 g $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_6$ (Calciumlaktat), 7,84 g $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ (Natriumacetat) und mit Reinstwasser aufgefüllt, bis die Lösung 2000 ml ergab. Zur Einstellung des pH-Wertes 6,5 wurden einige Tropfen 25%iger Milchsäure benötigt. Die Demineralisationslösung aus 66,75 ml Essigsäure (96%) und 1,306g Hydroxylapatit wurde in einem 1l-Becherglas bis auf 950 ml mit Reinstwasser aufgefüllt. Danach wurde der pH-Wert gemessen, mittels NaOH bis auf den pH-Wert von 3,5 eingestellt und im Anschluss auf 1000 ml mit Reinstwasser aufgefüllt.

Bei diesem Verfahren wurden die Probekörper abwechselnd von den beiden Medien umspült und nach jeweils 2 Minuten mikroradiografisch direkt im Messkanal gemessen, um das Mineralisationsverhalten der Prüfkörper zu untersuchen. Zunächst wurde eine Demineralisation, dann eine Remineralisation und nochmals eine Demineralisation durchgeführt. Auf diese

Weise wurde versucht, das Körpermilieu nachzustellen. Hierbei wurde zu Messung der Prüfkörperdicke ein Röntgen-Zweistrahlfotometer verwendet. Als Röntgenquelle diente ein Röntgeneratore (Philips PW 1729, Hamburg), die Beschleunigungsspannung betrug 21,28 kV. Ein Teil der Röntgenstrahlung wurde durch den Prüfkörper, ein weiterer Teil durch eine zuvor bestimmte Aluminiumreferenz gelenkt. Bei beiden wurde die Extinktion bestimmt und miteinander verglichen. Die Intensität des Röntgenstrahls konnte mit dem Lambert-Beerschen Absorptionsgesetz beschrieben werden, bei dem die Intensität I des transmittierten Lichts exponentiell mit der Dicke der Probe abnimmt:

$$I = I_0 e^{-\mu d}$$

I_0 Intensität des einstrahlenden Lichts

e Extinktionskoeffizient

μ Absorptionskoeffizient

d Probendicke

3.10 Statistik und Berechnung

Für alle Messwerte aus den Versuchsreihen des WST-1-Tests wurden die Mittelwerte berechnet und auf die Referenz normiert. Die Standardabweichungen wurden ebenfalls berechnet und in den Graphiken durch Fehlerbalken dargestellt. Für den Ergebnisteil wurden die Ergebnisse der verschiedenen Versuchstage zu einem Balken zusammengefasst und somit veranschaulicht. Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigen (Student`s) t-Test mit unterschiedlichen Varianzen von Microsoft Excel (Version 2003) errechnet.

4. ERGEBNISSE

4.1 Oberflächenanalyse mittels REM-Aufnahmen

Die Abbildungen zeigen exemplarisch einen Referenzprüfkörper aus Komposit in 500- und 3000-facher Vergrößerung (**Abb. 5 a** und **c**) und einen Prüfkörper aus Komposit mit Zusatz von CaKPO_4 in 500- und 3000-facher Vergrößerung (**Abb. 5 b** und **d**). Die Prüfkörper wurden analog zu den Prüfkörpern für den WST-Test hergestellt. Die Oberflächen waren dementsprechend geschliffen, aber nicht poliert. Bei 500- facher Vergrößerung lässt sich ein deutlicher Unterschied bezüglich der Oberflächenstruktur zwischen dem Komposit und dem Komposit mit Zusatz erkennen, was auf die unterschiedliche Schleifbarkeit zurückzuführen ist. Während in **5a** eine gleichmäßige Schliifstruktur vorliegt, ist in **5b** ein ungleichmäßiges Relief zu sehen. In den Abbildungen **5 c** und **d** bei einer 3000- fachen Vergrößerung lassen sich kaum noch strukturelle Unterschiede feststellen, da hier die durch den Schleifvorgang erzeugten Strukturen größer als der dargestellte Bildausschnitt sind.

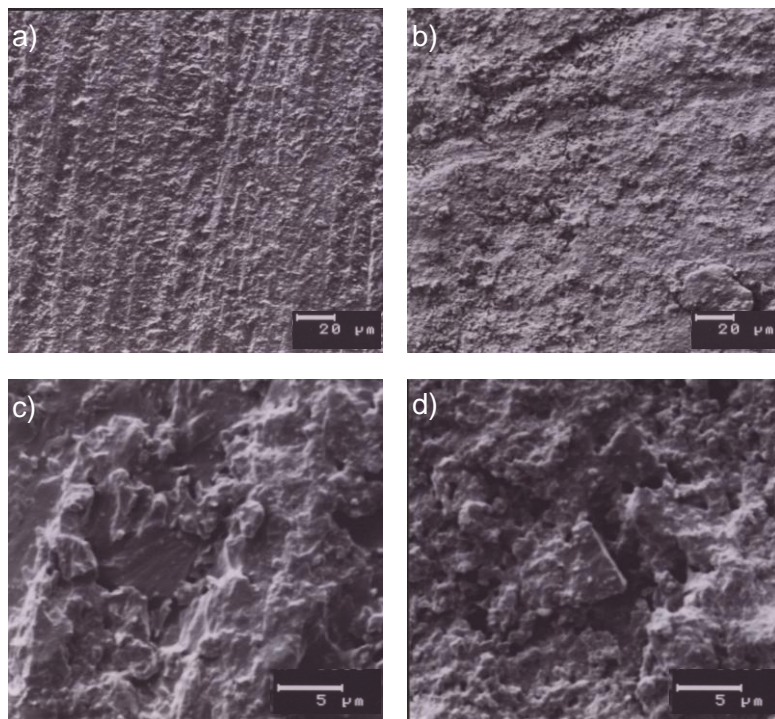


Abbildung 5 REM-Aufnahmen

- a) Komposit und b) Komposit mit CaKPO_4 bei 500-facher Vergrößerung
c) Komposit und d) Komposit mit CaKPO_4 bei 3000-facher Vergrößerung

4.1 Test der antimikrobiellen Eigenschaften

In den Vorversuchen wurden PMMA-Prüfkörper, PMMA-Prüfkörper mit CaKPO_4 -Zusatz und Kupferplättchen als Positivkontrolle auf LB-Agar inkubiert. Nach 24 Stunden konnten Hemmhöfe beobachtet werden. Jedoch konnte mittels dieser kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden, da die Hemmhöfe sich auf den verschiedenen Agarplatten in unterschiedlicher Ausprägung oder vereinzelt nicht bildeten.

Mittels WST-Test wurde die Zellaktivität und somit eine quantitative Aussage über das Bakterienwachstum getroffen werden. Im Folgenden sind die Balkendiagramme aufgeführt, welche die Auswertung der Versuche darstellen. Die Graphiken bilden einen Mittelwert aus mehreren Versuchen (mindestens 3). Im Vorversuch mit PMMA wurden mit Bakterien beimpfte, reine PMMA-Prüfkörper (jeweils dargestellt im linken Balken, gleich 100% gesetzt, z. B. **Abb. 6 a**) in Vergleich zu Prüfkörpern aus PMMA mit dem Zusatz von unterschiedlichen Calciumalkaliphosphaten (rechter Balken) gesetzt. Die ersten Versuche mit den PMMA-Prüfkörpern und dem Zusatz von CaKPO_4 wurden mit *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *epidermidis*, *Streptococcus salivarius* und dem Plaquemix durchgeführt. Weitere Versuche erfolgten mit PMMA-Prüfkörpern und den Zusätzen von CaNaPO_4 und $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ nur noch mit *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und dem Plaquemix. Im Versuchsteil Komposit wurden die mit Bakterien beimpften reinen Komposit-Prüfkörper (jeweils dargestellt im linken Balken, gleich 100% gesetzt) in Vergleich zu Prüfkörpern aus Komposit gesetzt, das nur noch den Zusatz CaKPO_4 (rechter Balken) enthielt. Hier wurden zunächst Versuche mit Prüfkörpern durchgeführt, die zum einen 25% und zum anderen 37% CaKPO_4 enthielten und mit *Klebsiella pneumoniae* beimpft wurden. Die weiteren Versuche mit den Komposit-Prüfkörpern wurden mit einem Zusatz von 25% weitergeführt. Sie erfolgten mit *Klebsiella pneumoniae*, Plaquemix, *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus mutans*. Die Signifikanz ist hier nicht gesondert gekennzeichnet, da sie bis auf eine Ausnahme überall gegeben ist ($p < 0,05$).

4.1.1 Versuchsteil PMMA

Folgende Abbildungen (**Abb. 6 - 8**) zeigen die Ergebnisse der WST-Tests für den Versuchsteil mit den PMMA-Prüfkörpern. Die Signifikanz wurde für jeden einzelnen Test bestimmt. Der Wert p lag bis auf eine Ausnahme (**Abb. 6 e**) unter 0,05, weshalb die Signifikanz in allen anderen Diagrammen nicht gesondert gekennzeichnet ist. Der Zusatz an Calciumalkaliphosphaten lag jeweils bei 50%. In den jeweiligen Balkendiagrammen sind die zugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

Versuche mit Zusatz von CaKPO_4

Für den Zusatz von CaKPO_4 zum PMMA (**Abb. 6**) konnte eine Keimreduktion von 92,65% (Klebsiellen, **6a**) bis 75,94% (*Staphylococcus epidermidis*, **6b**) gegenüber der Referenz beobachtet werden. Nur gegenüber *Streptococcus salivarius* zeigte der Werkstoff keine hemmende Wirkung. Man konnte sogar einen Bakterienzuwachs um 26% bei einer Standardabweichung von 18,52% feststellen, hier lag zudem kein signifikanter Unterschied vor.

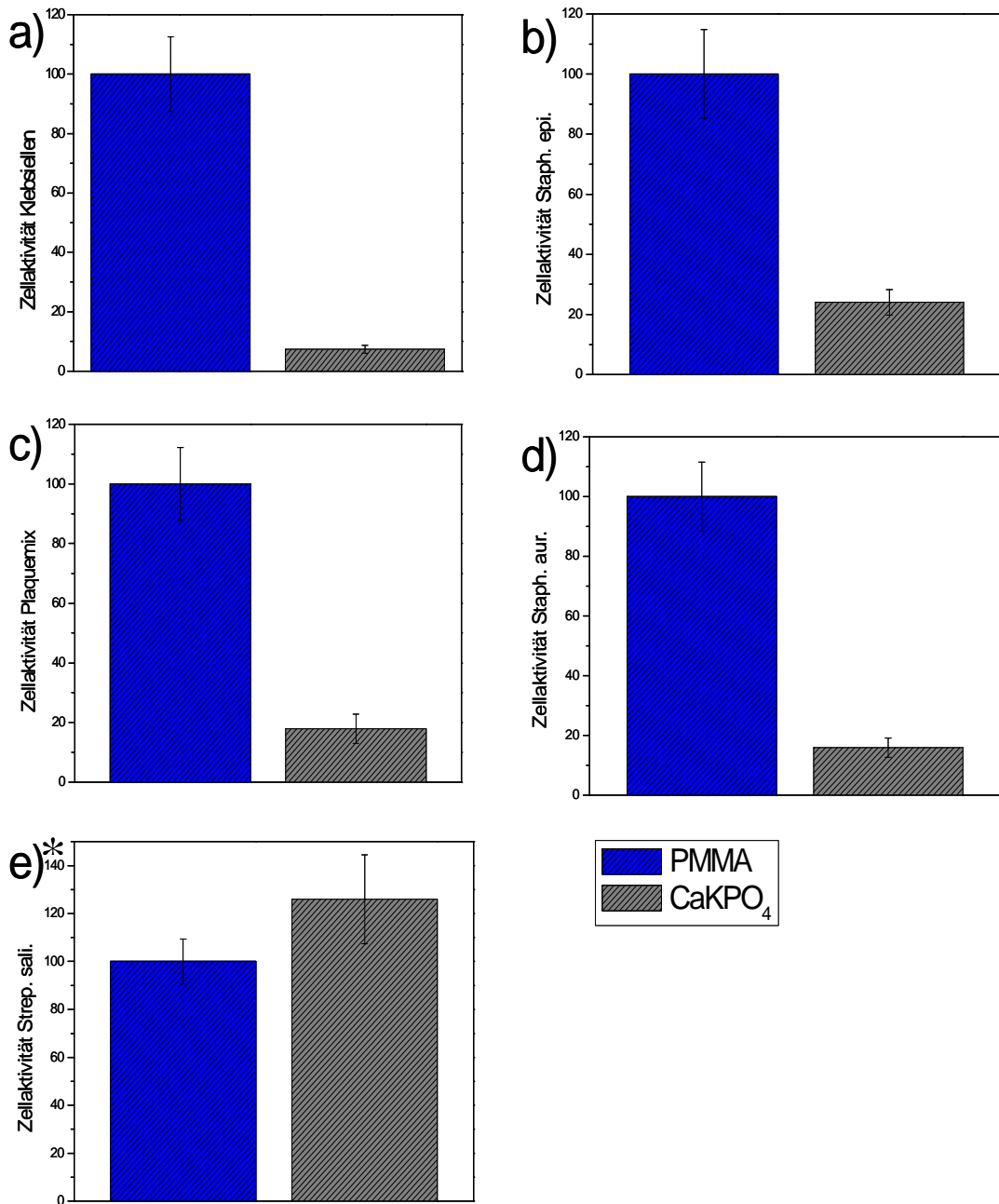


Abbildung 6 PMMA-Prüfkörper ohne Zusatz als Referenz (100%) und mit Zusatz von CaKPO₄ beimpft mit:
a) *Klebsiella pneumoniae*, b) *Staphylococcus epidermidis*, c) Plaquemix
d) *Staphylococcus aureus* und e) *Streptococcus salivarius* , * $p > 0,05$

Versuche mit Zusatz von CaNaPO_4

Für den Zusatz von CaNaPO_4 zum PMMA (**Abb. 8**) konnte eine Keimreduktion von 73,62% (Plaquemix, **7 b**) bis 25,32% (*Staphylococcus aureus*, **7 c**) gegenüber der Referenz beobachtet werden.

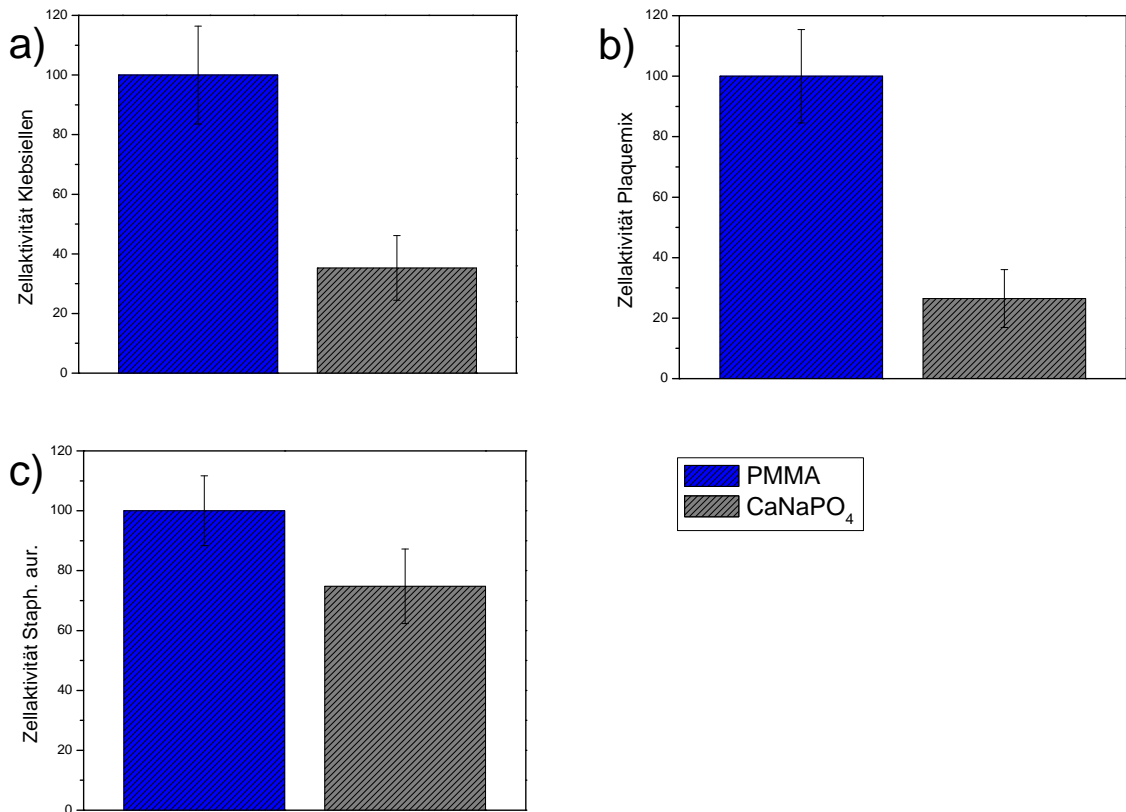


Abbildung 7 PMMA-Prüfkörper ohne Zusatz als Referenz (100%) und mit Zusatz von CaNaPO_4 beimpft mit:
a) *Klebsiella pneumoniae*, b) Plaquemix und c) *Staphylococcus aureus*

Versuche mit Zusatz von $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$

Für den Zusatz von $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ zu den Kompositen (**Abb. 8**) konnte eine Keimreduktion von 85,36% (Klebsiellen, **8 a**) bis 63,34% (*Staphylococcus aureus*, **8 c**) gegenüber der Referenz beobachtet werden.

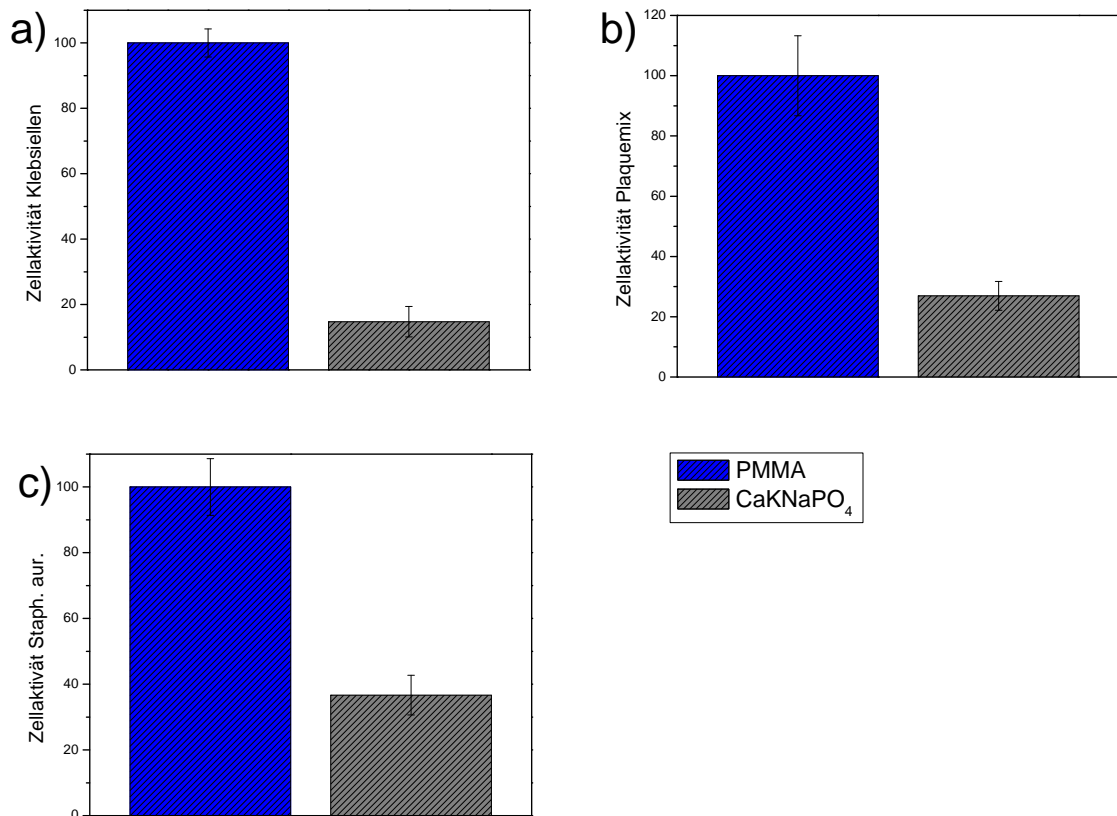


Abbildung 8 PMMA-Prüfkörper ohne Zusatz als Referenz (100%) und mit Zusatz von $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ beimpft mit:
a) *Klebsiella pneumoniae*, b) Plaquemix und c) *Staphylococcus aureus*

4.1.2 Versuchsteil Komposit

Für folgende Abbildungen wurde jeweils die Signifikanz berechnet. Sie lag immer unter 0,05. Der Zusatz an Calciumalkaliphosphaten lag jeweils bei 50%, bei Abweichungen wurde dies gesondert gekennzeichnet. In den jeweiligen Balkendiagrammen sind die zugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

Versuche mit Zusatz von CaKPO_4

Zunächst wurde für den Zusatz von CaKPO_4 zu den Kompositen (**Abb. 9**) die jeweilige Keimreduktion bei Klebsiellen bei Zugabe von 37% und bei 25% CaKPO_4 getestet. Bei 37% ergab sich eine Keimreduktion von 72,15% (**9 a**), bei 25% eine Keimreduktion von 77,55% (**9 b**). Da diese Werte eng beieinander liegen, die Reduktion bei einer niedrigeren Zugabe sogar noch höher war und die Prüfkörper zudem bei nur 25% eine homogenere Struktur aufwiesen, wurde bei allen Folgeversuchen nur noch diese Rezeptur verwendet. Es konnte eine Keimreduktion von 78,13% (*Staphylococcus aureus*, **9 d**) bis 35,09% (*Streptococcus mutans*, **9 e**) gegenüber der Referenz beobachtet werden.

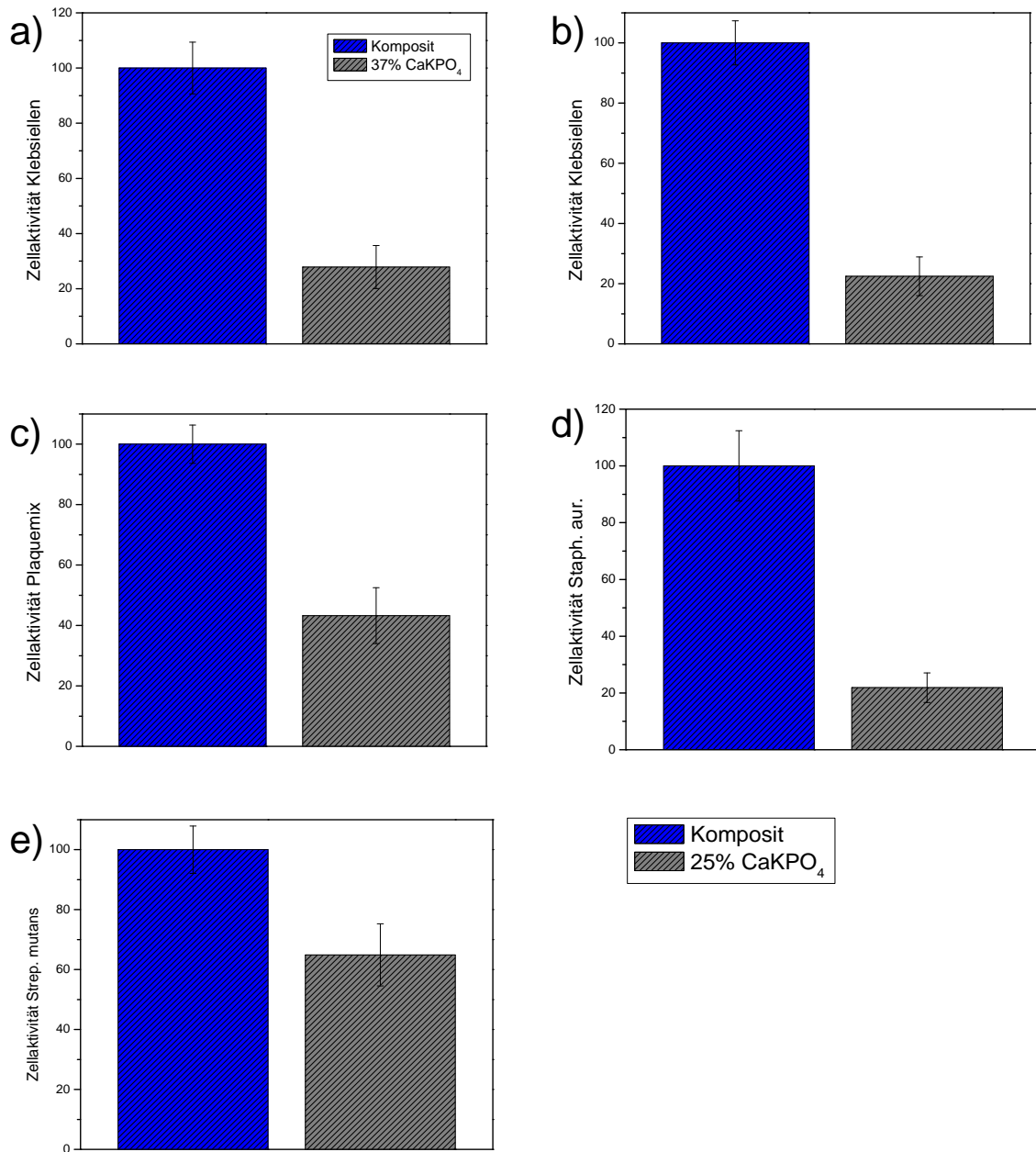


Abbildung 9 Komposit-Prüfkörper ohne Zusatz als Referenz (100%) und mit Zusatz von 37% a) CaKPO₄ bzw. b) - e) 25% CaKPO₄, beimpft mit: a) *Klebsiella pneumoniae* mit Zusatz von 37% CaKPO₄, b) *Klebsiella pneumoniae*, c) Plaquemix, d) *Staphylococcus aureus* und e) *Streptococcus mutans*

Versuche mit Zusatz von CaNaPO_4

Für den Zusatz von CaNaPO_4 zu den Kompositen (**Abb. 10**) konnte eine Keimreduktion von 59,42% (Plaquemix, **10 a**) bis 53,85% (*Staphylococcus aureus*, **10 b**) gegenüber der Referenz beobachtet werden.

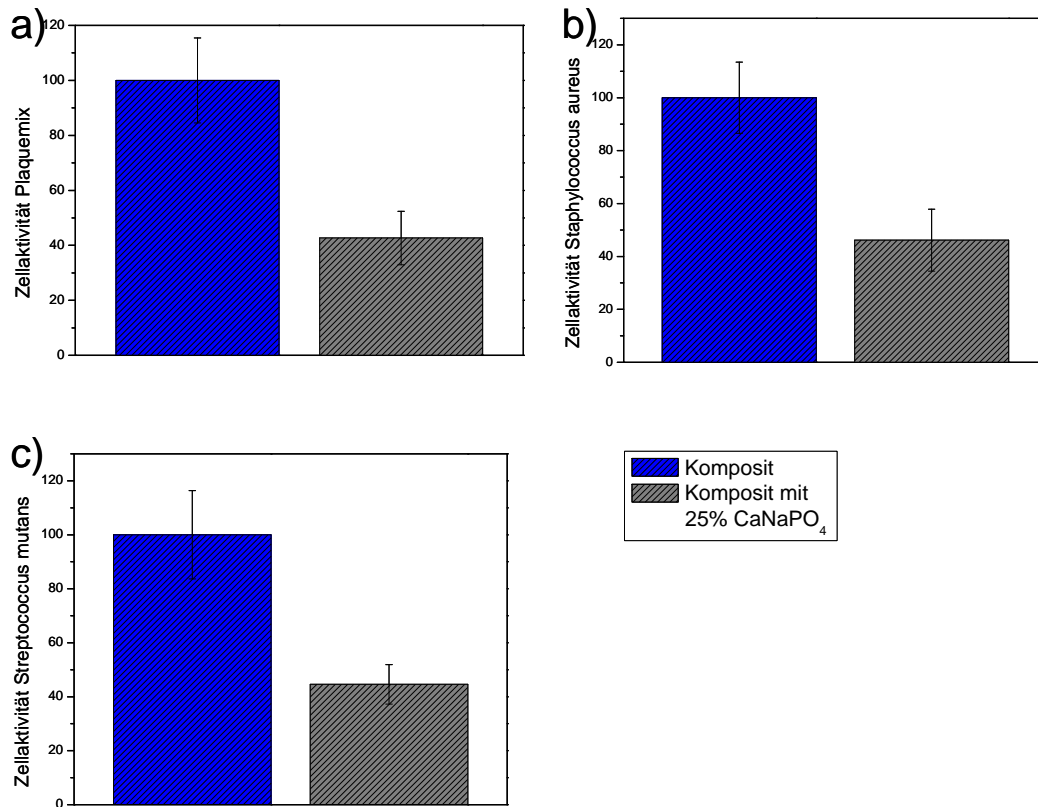


Abbildung 10 Komposit-Prüfkörper ohne Zusatz als Referenz (100%) und mit Zusatz von 25% CaNaPO_4 beimpft:
a) Plaquemix, b) *Staphylococcus aureus*, c) *Streptococcus mutans*

Versuche mit Zusatz von $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$

Für den Zusatz von $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ zu den Kompositen (**Abb. 11**) konnte eine Keimreduktion von 68,58% (*Staphylococcus aureus*, **11 b**) bis 39,96% (*Streptococcus mutans*, **11 c**) gegenüber der Referenz beobachtet werden.

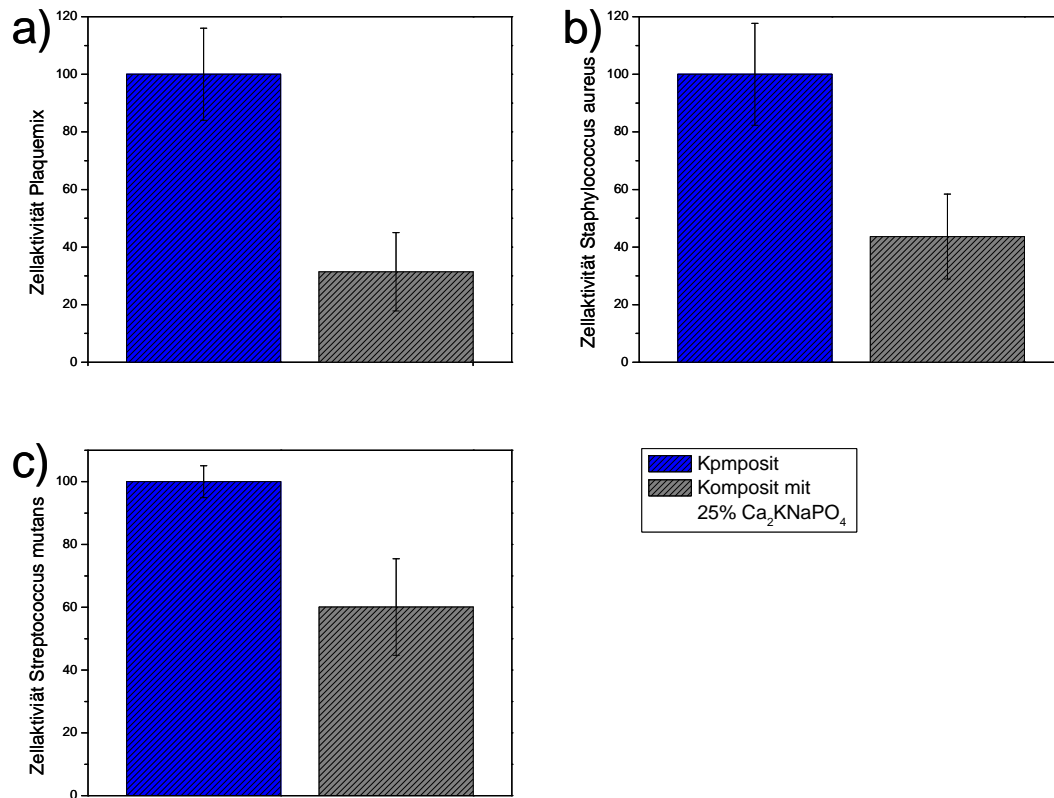


Abbildung 11 Komposit-Prüfkörper ohne Zusatz als Referenz (100%) und mit Zusatz von 25% $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ beimpft:
a) Plaquemix, b) *Staphylococcus aureus* und b) *Streptococcus mutans*

Zusammenfassung der WST-Ergebnisse

Der Hauptversuch mit den Kompositen zeigte, dass eine grundsätzliche Bakterienreduktion eintrat (**Abb. 12**). Man konnte allerdings keine Aussage darüber treffen, ob bei einem bestimmten Komposit oder einer bestimmten Bakterienkultur eine absehbare Reduktion zu erwarten ist. Relativ konstant in der Reduktion zeigte sich CaNaPO_4 in Bezug auf die unterschiedlichen Bakterienkulturen.

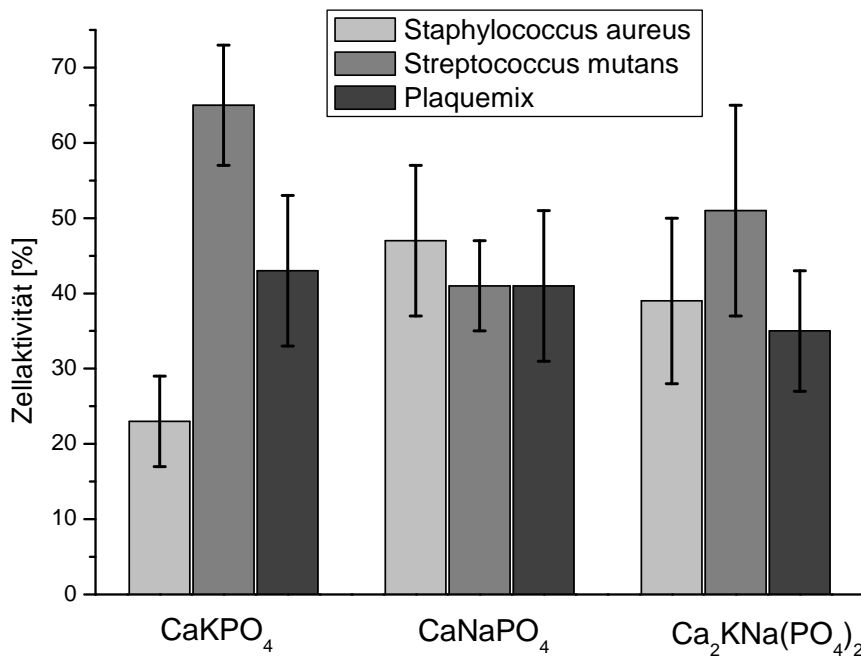


Abbildung 12 Vergleich der Zellaktivität (%) auf den Kompositen: Bakterienbeimpfung mit *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* oder Plaquemix der unterschiedlich dotierten Komposite mit CaKPO_4 , CaNaPO_4 und $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$; als Referenz (100 %) reines Komposit

4.2 Verlauf der pH-Wertmessung

Über einen Zeitraum von 9 Tagen wurde der Einfluss der verschiedenen Prüfkörper auf den pH-Werten in LB-Medium (pH 6,795) gemessen. Zunächst war ein Anstieg zu verzeichnen (höchster Wert $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$: pH 7,095), nach 9 Tagen näherte sich der pH-Wert wieder dem Anfangswert an (**Abb.13**).

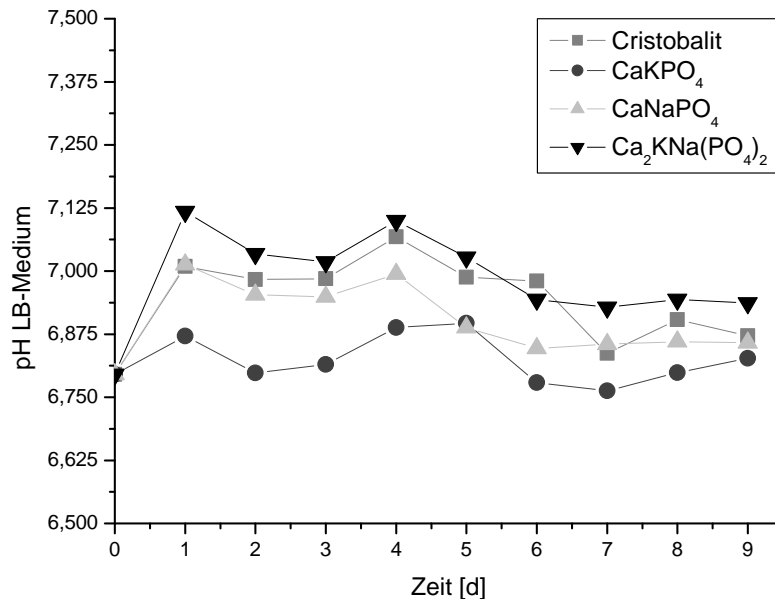


Abbildung 13 Verlauf der pH-Wert-Kurve des LB-Mediums nach Inkubation mit Unterschiedlichen Prüfkörper (reines Komposit, CaKPO_4 , CaNaPO_4 und $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$) über einen Zeitraum von 9 Tagen

4.3 Konversionsrate

Abbildung 14 zeigt typische Raman-Spektren von Kompositen vor und nach der Polymerisation. Deutlich zu erkennen ist eine Abnahme der vinylischen $\text{C}=\text{C}$ Doppelbindungs-Peaks bei 1643 cm^{-1} , die sich nach der Aushärtung einstellt. Die Berechnung des Konversionsgrades ($n = 3 \pm \text{SD}$), basierend auf den Peak-Flächen der vinylischen und aromatischen $\text{C}=\text{C}$ Doppelbindungs-Peaks, zeigt für $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ mit 64% und CaNaPO_4 mit 66% ähnliche Ergebnisse. Diese fielen höher als beim reinen Cristobalit (57%) aus. Das CaKPO_4 dotierte Komposit erreichte einen Wert von etwa 45% (**Abb. 14**).

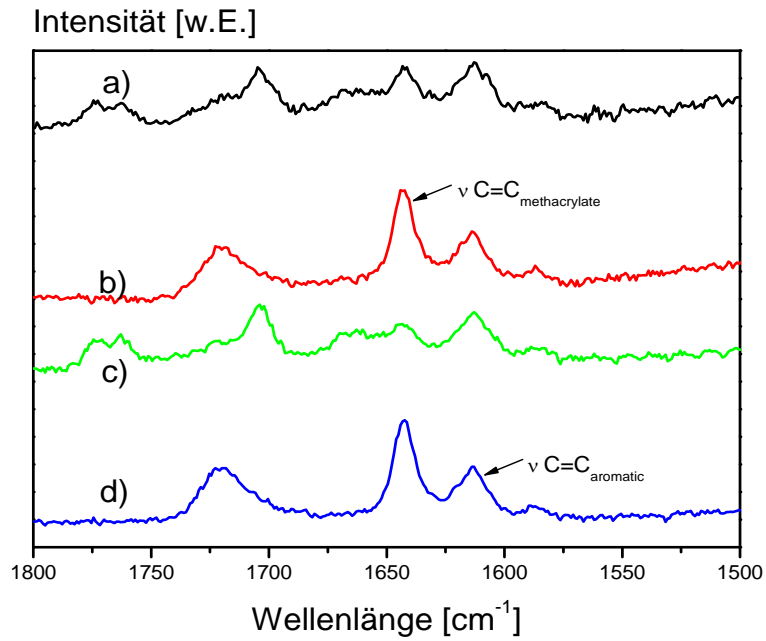


Abbildung 14 Ramanspektren: Cristobalit-Komposit (a) nach und (b) vor der Aushärtung, Cristobalit/CaNaPO₄ - Komposit (c) nach und (d) vor der Aushärtung

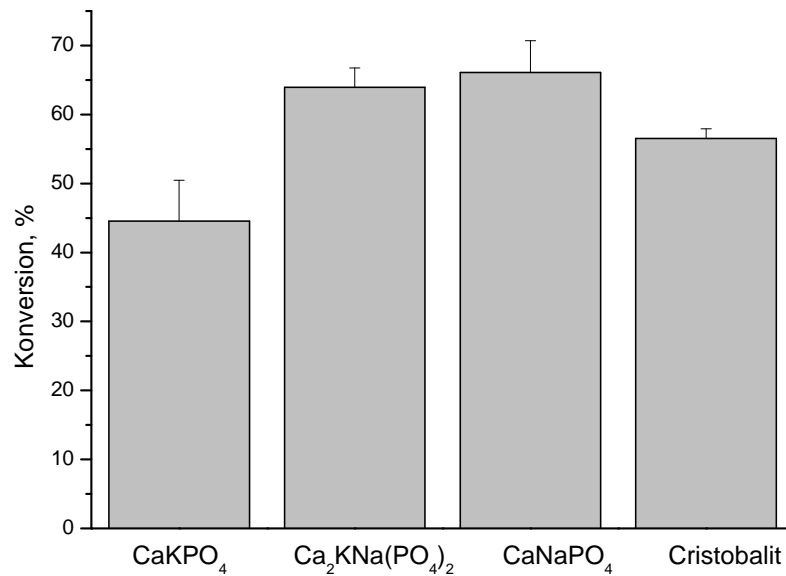


Abbildung 15 Berechnete Konversionsrate der einzelnen Komposite (%)
Balkendiagramm der Konversionsgrade der verschiedenen Komposite nach Aushärtung (n=3)

4.4 Biegefestigkeit

Die Ergebnisse der 3-Punkt Biegefestigkeitsuntersuchung ($n = 5 \pm \text{SD}$) für die unterschiedlichen Komposite sind in **Abbildung 16** dargestellt. Mit etwa 77 MPa zeigte das Referenz-Komposit mit Cristobalit als Füllstoff den höchsten Wert. Für CaKPO_4 und CaNaPO_4 gefüllte Komposite wurde ein Wert von etwa 55 MPa ermittelt, für $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ lag die Biegefestigkeit bei ca. 64 MPa.

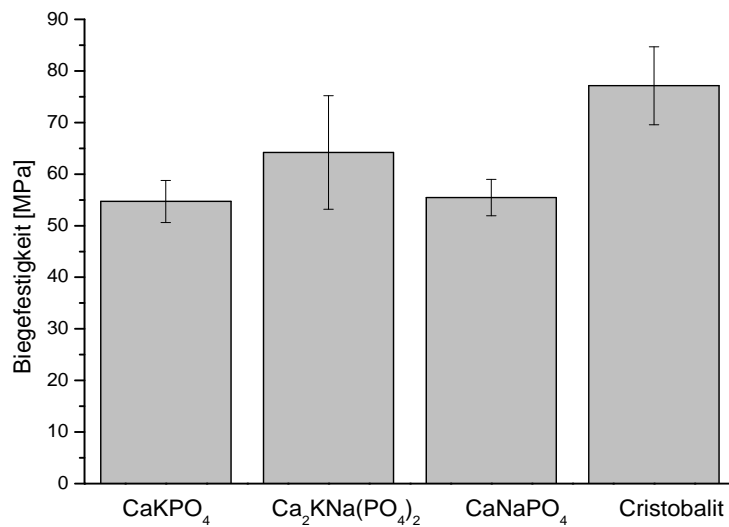


Abbildung 16 Biegefestigkeit [MPa] der verschiedenen Komposite (CaKPO_4 , CaNaPO_4 , $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ und reines Komposit) nach der Aushärtung und 24 h- Lagerung in einem 37 °C Wasserbad

4.5 Röntgenopazität

Auf einem zahnärztlichen Film wurden jeweils der Probekörper und eine Röntgentreppe aus Aluminium angeordnet und gemäß DIN- Vorschrift geröntgt. Die Komposite enthielten keine röntgenopaken Metalloxide wie sie in herkömmlichen Kompositen enthalten sind. Es wurde jeweils getestet: das reine selbst hergestellte Komposit, Komposit mit CaKPO_4 (**Abb. 17**), mit CaNaPO_4 und mit $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$. Die Analyse erfolgte mittels der Computer-Software Image J, mit welcher die Grauwerte gemessen wurden. Beispielshalber sollen die Ergebnisse des Komposits mit CaKPO_4 aufgezeigt genannt werden, die übrigen Werte sind tabellarisch aufgelistet (**Tab. 5**).



Abbildung 17 Zahnfilm mit Prüfkörper aus alkaliphosphatdotiertem Komposit (oben) und Aluminium- Stufentreppe (unten) mit ansteigender Dicke von rechts nach links

Der gemittelte Grauwert des 1mm dicken Prüfkörpers betrug 35,2, die Stufe mit gleicher Dicke ergab 49,4. Um den Standard zu erfüllen, musste der Wert des Prüfkörpers zumindest mit dem der gleichen Dicke der Röntgentreppe übereinstimmen oder höher sein. Die geforderten Werte wurden mit keinem der Prüfkörper erreicht, die Röntgenopazität kann als nicht ausreichend beschrieben werden. Die Werte werden im Allgemeinen in Prozent angegeben, so hätten die Prüfkörper eine Absorption der Röntgenstrahlung von nur etwa 60 - 70% (gemessen an Al 99,5%).

	Komposit	CaKPO ₄	CaNaPO ₄	Ca ₂ KNa(PO ₄) ₂
Prüfkörper 1mm	33,2	35,2	33,4	29,6
Al-Stufe 1mm	50,3	49,4	47,3	48,0

Tabelle 5 Übersicht über die Grauwerte der Prüfkörper mit den jeweiligen Zusätzen und den dazugehörigen Werten der Aluminiumtreppe gleicher Höhe (1mm)

4.6 Remineralisations- und Demineralisationsverhalten

Mittels Remineralisations- und Demineralisationstest, auch TWIX-Test genannt, sollte das Komposit auf seine Fähigkeiten zur Remineralisation bzw. Demineralisation getestet werden, indem versucht wurde, das Körpermilieu nachzuempfinden.

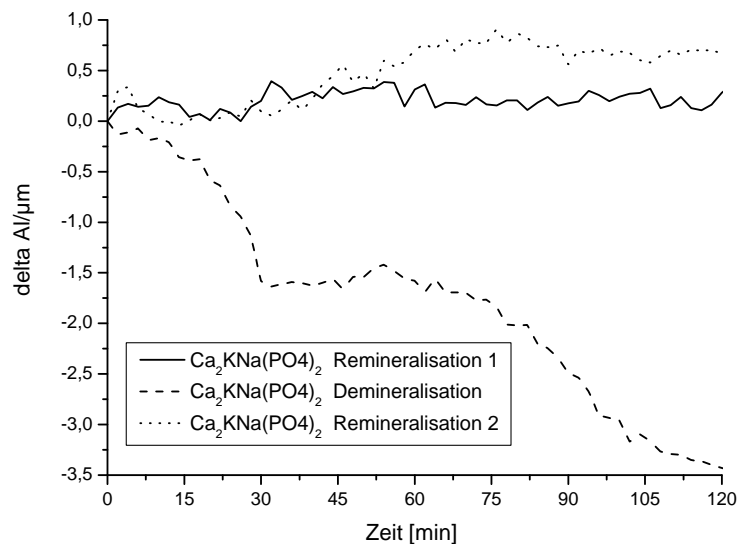


Abbildung 18 TWIX-Test: Remineralisation und Demineralisation (delta Al/µm) in Abhängigkeit von der Zeit

Exemplarisch wurde das Komposit mit Ca₂KNa(PO₄)₂ untersucht. Hierbei wurden die Prüfkörper zunächst von einer Remineralisationslösung, danach von

einer Demineralisationslösung und zuletzt nochmals von einer Remineralisationslösung umspült. Die Ergebnisse dieses Tests über einen Zeitraum von 120 min wurden in μm Aluminium-Gleichwert gemessen und konnten mit Hilfe des Aluminiumäquivalents und der experimentell bestimmten Dichte in mg/cm^2 Probenoberfläche umgerechnet und als Massenänderung dargestellt werden (**Abb. 18**). Die beiden Tests mit der Remineralisationslösung zeigten keine erwähnenswerten Ergebnisse, der Test mit der Demineralisationslösung jedoch zeigte einen Anstieg der Kurve und somit eine deutliche Demineralisation des Prüfkörpers. Die REM- Aufnahmen (**Abb. 19**), die zusätzlich exemplarisch erstellt wurden, zeigen exemplarisch einen Prüfkörper vor und nach der Versuchsreihe. Die erste Abbildung zeigt eine glatt polierte Oberfläche, die zweite zeigt Porositäten von etwa 1 – 5 μm .

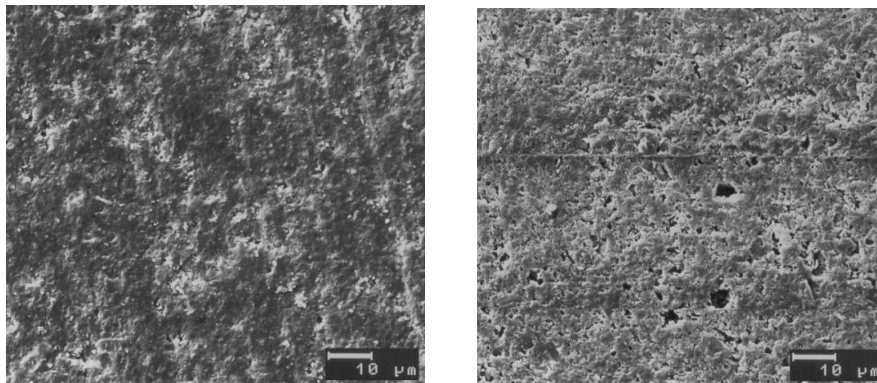


Abbildung 19 REM-Aufnahmen des Komposits vor und nach der Demineralisation bei einer 500-fachen Vergrößerung

5. DISKUSSION

5.1 Ausgangspunkt

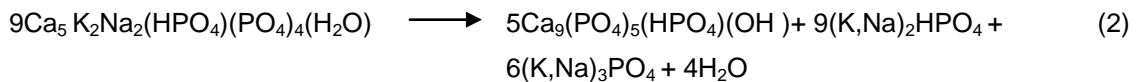
Wie bereits erwähnt, gehören zu den Anforderungen, die an einen heutigen Füllungswerkstoff in der Zahnheilkunde gestellt werden, unter anderem gute Verarbeitbarkeit im oralen Milieu, Ästhetik, Biokompatibilität, Form- und Volumenstabilität, Röntgenopazität und adäquate mechanische Eigenschaften. Dementsprechend werden auf diesem Gebiet Forschungen betrieben, die diese Eigenschaften weiter verbessern sollen. Weiterhin spielt die Karies bzw. Sekundärkaries eine große Rolle für die Langlebigkeit einer Kompositfüllung. Ein Ansatzpunkt zur Verbesserung bestehender Werkstoffe bezieht sich deshalb auf die Möglichkeit, über einen Wirkstoff im Komposit antibakterielle Wirksamkeit hervorzurufen.^{18,19,20}

Gegenstand dieser Arbeit war es, solch ein antimikrobiell wirksames Komposit mit Calciumalkaliphosphaten als Füllstoffen herzustellen. Zur Anwendung sollte es vor allem im dentalen Bereich kommen, wo es als Füllungsmaterial der durch Karies entstandenen Kavitäten dienen könnte. Komposite an sich weisen im Vergleich zu anderen Werkstoffen der Zahnheilkunde, wie Metall oder Keramik, eine höhere Wahrscheinlichkeit für Bakterienanlagerung auf.⁸⁰ Deshalb existieren bereits Strategien, die darauf ausgerichtet sind, antimikrobielle Wirksamkeit bei Kompositen hervorzurufen. So kann etwa die organische Matrix des Komposits mit antimikrobiell wirksamen Verbindungen wie Methacryloyloxydodecylpyridinbromid (MDPB) modifiziert werden. MDPB wird als wirksamer antimikrobieller Zusatz beschrieben, der nicht freigesetzt wird, sondern über die positiv geladene Pyridiniumgruppe das elektrische Gleichgewicht der Zellmembran stört, sodass das Bakterium abstirbt.^{19,74} Weiterhin werden den Kompositen beispielsweise Fluoride oder CHX hinzugefügt, um einen antimikrobiellen Effekt zu bewirken.^{17,65,69} Zudem wurde gezeigt, dass durch Silber-Nano-Partikel in Kompositen ein antibakterieller Effekt ohne Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften eintritt.⁸¹ Auch durch Bildung eines starken alkalischen pH-Wertes in der Umgebung des Materials $\text{Ca}(\text{OH})_2$ kann eine antibakterielle Wirkung erzielt werden, was in der Zahnheilkunde beispielsweise vielfältig als Überkappungsmaterial zur Anregung

der Tertiärdentinbildung oder auch zur Behandlung von infizierten Wurzelkanälen genutzt wird.⁵¹ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ wird zudem als Suspension oder als selbsthärtender Zement durch die Reaktion von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und Salicylat-Ionen zu Calcium-Salicylat oder durch Hinzufügen zu photochemisch härtenden Methacrylatharzen zur Anwendung.^{82,83} Auch bei Calciumalkaliphosphat dotierten Zementen wurden zuvor bereits antimikrobiellen Eigenschaften nachgewiesen.²²

5.2. Wirkung und Reaktion

In dieser Arbeit sollte nun die antimikrobielle Wirkung von Calciumalkaliphosphat dotierten Kompositen geprüft werden. Es wurde bereits gezeigt, dass mineralische Calciumalkaliphosphat-Zemente stärkere antimikrobielle Eigenschaften gegen orale Mikroorganismen besitzen als $\text{Ca}(\text{OH})_2$.²² Diese Verbindungen bilden in einer Lösungs-/Fällungsreaktion eine Matrix aus unlöslichem Hydroxylapatit und löslichen Alkaliphosphaten und -hydroxiden. Diese werden von der Matrix freigegeben und bewirken einen Anstieg des pH-Werts auf etwa 12-13 im umgebenden Milieu. Für das Abbinden solcher Zemente wird eine Zwei-Phasen-Reaktion angenommen.⁸⁴ Zunächst wird Alkali dotierter Nano-Apatit nach Gleichung 1 gebildet. Dieser ist verantwortlich für die schnelle Härtung der Zementpaste. Er wird im Folgenden ausgelaugt und nach Gleichung 2 zu calciumarmen Hydroxylapatit umgewandelt:²²



Diese Reaktionen könnten auch auf die Alkaliphosphat dotieren Komposite übertragbar sein. Die mechanische Aktivierung des Calciumalkaliphosphats durch Mahlen sollte dabei nicht nur zur Zerkleinerung der Partikel dienen, sondern auch die Löslichkeit und Reaktivität fördern. Die $(\text{PO}_4)^{3-}$ Freisetzung von Calciumalkaliphosphat-Füllern kann einen pH-Wert Anstieg bewirken. Die alkalisierende und bakterizide Wirkung wäre hier vergleichbar mit der

hinreichend bekannten von $\text{Ca}(\text{OH})_2$, welche von der Menge an OH^- -Ionen abhängig ist.⁸⁵ Eine pH-Wert-Änderung konnte zwar in vorliegender Arbeit im dazugehörigen Test nur initial festgestellt werden, doch könnte der Anstieg nur lokal an der Oberfläche der Prüfkörper stattfinden und sich nicht auf das umgebende Medium auswirken. Diese lokale Wirkung könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass der Agardiffusionstest keine verwertbaren Ergebnisse erbrachte. Ein zusätzlicher antimikrobieller Effekt könnte auf dem Vorhandensein von Kationen im Komposit basieren. Ca^{2+} , Na^{2+} und K^+ können, ähnlich wie bei bioaktiven Gläsern an der Oberfläche freigesetzt werden und durch einen lokal angehobenen osmotischen Druck die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen beeinflussen.⁸⁶

5.3 Herstellung der Prüfkörper und Durchführung des antimikrobiellen Tests

Um Tests mit den Kompositen durchführen zu können, wurde zunächst im Labor ein eigenes Komposit hergestellt. Das Calciumalkaliphosphat wurde gemahlen, was nicht nur die Partikelgröße reduzierte, sondern auch der mechanischen Aktivierung diente. Letztere ist bedingt durch das Auftreten von Defekten und Versetzungen im Kristallgitter der Verbindungen und steigert sowohl die Löslichkeit als auch die Reaktivität.⁸⁷ Das gemahlene Calciumalkaliphosphat wurde gemeinsam mit dem Füllkörper Cristobalit über Silanisierung mit der anorganischen Matrix aus BisGMA und TEGDMA verbunden. Das selbst hergestellte Komposit genügte allen Anforderungen dieser Versuche. Alternativ hätte auch ein kommerzielles, fließfähiges Komposit verwendet werden können, was allerdings einen hohen Kostenfaktor dargestellt hätte.

Bakterientests werden im Allgemeinen mittels Agardiffusionstest erstellt.⁸⁸ Dieser lieferte hier jedoch keine verwertbaren Ergebnisse. Dies könnte man vor allem darauf zurückzuführen, dass sich aus den Prüfkörpern keine oder nicht ausreichende Mengen an antimikrobiellen Ionen oder Partikeln gelöst haben, welche nach Diffusion in das Gel eine Wirkung abseits des Prüfkörpers hätten erzielen können. Zusätzlich könnte auch die Pufferwirkung des Agars die

antimikrobielle Wirkung beeinflusst haben. Aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz des Komposits konnte keine Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop stattfinden.

In dieser Arbeit wurde mit dem sogenannten WST-1 Test gezeigt, dass ein deutlicher antimikrobieller Effekt besteht. Das WST1-Reagenz wird umgesetzt von der Succinatdehydrogenase und wurde bereits in vorangegangenen Studien zum Nachweis bakterieller Aktivität verwendet.²³ Die Succinatdehydrogenase ist sowohl in bakteriellen als auch in eukaryontischen Mitochondrien zu finden, was auf die Endosymbiontentheorie zurückgeführt wird. Diese geht davon aus, dass Bakterien von anderen prokaryontischen Zellen aufgenommen wurden und sich zu Zellorganellen wie Mitochondrien und Plastiden, in ihren Wirtszellen entwickelt haben.⁸⁹ Der angewandte Test nutzt nun die mitochondriale Succinathydrogenase, um eine quantitative Aussage über die bakterielle Aktivität auf den Prüfkörpern aufzuzeigen und könnte somit auch für ähnliche Fragestellungen herangezogen werden.

5.4 Eigenschaften

Die Ergebnisse der hauptsächlichsten Tests der antimikrobiellen Eigenschaften zeigten alle mit Ausnahme der Testreihe mit *Streptococcus salivarius* eine Bakterienreduktion, wobei das Ausmaß der Reduktion sehr unterschiedlich ausfiel. Konstant war die gemessene Bakterienreduktion, bezogen auf den Zusatz, bei CaNaPO_4 , hier lag die Reduktion bei etwa 50-60%. Ebenso konstant zeigte sie die Reduktion bezogen auf die Bakterien, beim Plaquemix bei ebenfalls 50-60%. Der Plaquemix entstammte einer Probe, die einem Patienten entnommen worden war und nicht näher bestimmt wurde. Dieses Vorgehen wurde auch schon in anderen Studien beschrieben.^{90,91} Die besten Ergebnisse lieferten die Tests mit *Staphylococcus aureus* bei der Zugabe von CaKPO_4 mit fast 80%. Die geringste Reduktion trat bei *Streptococcus mutans* mit der Zugabe von CaKPO_4 mit etwa 35% auf. Die Reduktion von *Streptococcus mutans* wäre besonders wünschenswert, da er zusammen mit *Streptococcus sanguinis* zu den häufigsten Mikroorganismen der Mundhöhle

und zu den Haupterregern der Karies gehört. Er ist widerstandsfähig gegen den Speichel, der ein körpereigenes Abwehrsystem darstellt, und kann bereits im frühkindlichen Alter übertragen werden.⁹² Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf die Situation „in vivo“ darf allerdings nicht geschehen. Zwar wurde mit den verschiedenen verwendeten Bakterienstämmen und dem Plaquemix ein relativ breites Spektrum abgedeckt, doch wiesen bereits in den „In vitro“-Versuchen die Bakterienkulturen unvorhersehbare Wachstumsmuster und somit Ergebnisse auf, obwohl die Durchführung der Tests immer gleichbleibend war. Weiterhin können bei Vorgängen wie Absaugen des Nährmediums und PBS-Waschung Ungenauigkeiten kaum verhindert werden, da hierbei Teile des Bakterienfilms vom Probekörper abgerissen werden können.

In anderen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass beispielsweise Komposite mit Polyethylenimin-Nanopartikeln in 4 wöchigen Testreihen eine sehr starke Bakterienreduktion von *Streptococcus aureus* um mehr als 90 % ergaben.⁹³ Die besten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lagen bei etwa 80 % Reduktion von *Streptococcus aureus* mit CaKPO₄ dotiertem Komposit, wobei die Messung einmalig nach 24 Stunden erfolgte. In einer anderen Studie lieferten Komposite mit Zusatz an DMAE-CB nach 16 Stunden Reduktionswerte von *Streptococcus mutans* um etwa 10 %.⁹⁴ Die besten Ergebnisse dieser Testreihe lagen bei etwa 50% Reduktion von *Streptococcus mutans* mit CaNaPO₄ dotiertem Komposit. Auch werden, wie bereits beschrieben, antibakterielle Zusätze wie MDBP, Nanosilberpartikel oder Fluoride vielfältig in der Literatur beschrieben, doch da die Durchführungen der Tests sehr unterschiedlich sind, kann nur schwer ein Vergleich über die genaue Wirkung der unterschiedlichen Zusätze gezogen werden. Hier ist zu nennen, dass der Agardiffusionstest in einigen Studien herangezogen werden konnte, in anderen wie dieser ergebnislos verlief. Die Dauer und Anzahl der Messungen differierten zudem stark, weiterhin die verwendeten Bakterienarten und Medien.

Bei der Testung der pH-Werte konnte zwar initial ein leichter Anstieg verzeichnet werden, dann fiel der pH- Wert wieder auf den Anfangswert zurück. Die Werte wurden im Nährmedium LB gemessen, das für alle Tests verwendet wurde. Der Anfangswert lag bei pH 6,8. Der stärkste Anstieg war mit pH 7,1 beim Komposit

mit $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ zu vermessen, der schwächste mit pH 6,9, nicht wie erwartet beim reinen Komposit, sondern dem mit CaKPO_4 versetzten. Nach 9 Tagen lagen die Werte aller Prüfkörper zwischen 6,8 und 7,0.

Der pH-Wert des menschlichen Speichels vergleichsweise liegt bei Ruheseekretion zwischen 6,5 und 6,9, bei Stimulation kann der Wert bis zu 7,2 ansteigen.⁹⁵ Der Versuch hätte auch mit künstlichem Speichel durchgeführt werden können, doch LB-Nährmedium erschien sinnvoller, da es für alle vorangehenden WST-Tests verwendet wurde und einen ähnlichen pH-Wert aufweist. Die Werte wurden täglich mittels pH-Meter aus ca. 1 ml Überstand die Probenkörper entnommen. Somit war es nicht möglich, den exakten pH-Wert direkt am Probekörper zu bestimmen, sondern nur die Auswirkung auf die umgebende Flüssigkeit. Hier ist eine Übertragung auf die Situation „In vivo“ nicht gegeben, da in der Mundhöhle pro Tag zwischen 0,5 und 1,5 l Speichel produziert wird, wobei die Sekretionsrate stimuliert zwischen 1-2 ml und unstimuliert 0,3 ml pro Minute beträgt.⁹⁶ Die gemessenen Werte stellen also nur einen Anhaltspunkt für die vermuteten Vorgänge im Milieu um den Prüfkörper dar.

Auch die Konversionsrate war Gegenstand der Untersuchung und wurde mittels Raman-Spektroskopie getestet. Diese ist eine Analysemethode zur Materialcharakterisierung, die für zahlreiche Probenarten genutzt werden kann. Ebenso hätte die IR-Spektroskopie erfolgen können, die ebenfalls auf dem Grundprinzip der Anregung von Schwingungen beruht. Zu den Vorteilen der Untersuchung mittels Raman-Spektroskopie ist zu zählen, dass hierbei nicht nur Feststoffe, sondern auch (wässrige) Flüssigkeiten als Proben verwendet werden können. Weiterhin müssen die Proben keine bestimmte Größe aufweisen, müssen nicht speziell vorbereitet werden und sie werden bei der Durchführung nicht beschädigt. Die jeweiligen Spektren für das getestete Material sind einzigartig. Der hauptsächliche Nachteil ist die geringe Intensität des Raman-Effekts, die mittels oberflächenverstärkter Raman-Spektroskopie verbessert werden kann. Auch besteht die Gefahr der Überlagerung der Spektren durch Eigenfluoreszenz der Proben.^{97,98}

Die Eigenschaften des Komposits werden von der Konversionsrate der Kohlenstoffdoppelbindungen der Methacrylgruppen beeinflusst. Die Polymerisation, die man auch als Monomer-Polymer-Konversion bezeichnen kann, ist für zahnärztliche Komposite nie vollständig, da nicht alle Methacrylatgruppen reagieren. Der Grad der Monomer-Polymer-Konversion eines Komposits liegt bei etwa 60-70%.^{99,100} Die Werte des Komposits mit $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ liegen bei 64% und mit CaNaPO_4 bei 66% und somit im Bereich der geforderten Werte. Das Komposit mit CaKPO_4 hatte einer Konversionsrate von 45%, das Komposit mit reinem Cristobalit liegt bei 57%. Als ideales Verhältnis zur Steigerung der Konversionsrate gilt ein Masseanteil von 75 % Bis-GMA und 25 %TEGDMA.¹⁴

Tests der Biegefestigkeit zeigten, dass das selbst hergestellte Komposit den Standards entsprach, obwohl der Herstellungsprozess sehr einfach gehalten wurde. Die Versuche entsprachen der Norm für zahnärztliche Füllungskunststoffe EN ISO 4049. Für die Komposite mit Zusatz von CaKPO_4 und CaNaPO_4 wurde ein Wert von etwa 55 MPa, mit Zusatz von $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ etwa 64 MPa und für das Komposit mit reinem Cristobalit etwa 77 MPa erreicht. Somit zeigte das Komposit mit Cristobalit als Füllstoff den höchsten Wert, was darauf schließen lässt, dass die Calciumalkaliphosphate die Biegefestigkeit herabsetzten. Die in der Norm EN ISO 4049 vorgegebenen Werte $> 50 \text{ N/mm}^2$ wurden von allen getesteten Komposite erreicht. Die kommerziell erhältlichen Komposite weisen eine deutlich höhere Biegefestigkeit auf. In Anlehnung an ISO 4049 wurden beispielsweise für das Material "Tetric evoceram" (Ivoclar Vivadent AG) Werte von 139,9 MPa gemessen, das Material "Durafill" (Heraeus Kulzer GmbH) schnitt in dieser Testreihe mit 76,4 MPa am schlechtesten ab.¹⁴ Höhere Werte können darin begründet liegen, dass die getesteten Komposite durch jahrelange Forschungsarbeit beispielsweise in Homogenität oder Partikelgröße oder Zusammensetzung optimiert wurden.¹⁰¹

Die Standardwerte für die Röntgenopazität konnten im zugehörigen Test nicht als ausreichend getestet werden und sind nicht vergleichbar mit denen kommerzieller Komposite. Die Röntgenopazität von Schmelz liegt bei 215%, die von Dentin bei 118% Aluminiumgleichwertdicke. Kommerzielle Komposite

sollen Werte von mindestens 200% betragen, damit Kompositränder auf dem Zahnfilm erkennbar sind.¹⁰² Die Prüfkörper dieser Arbeit erreichten nur Werte von etwa 60-70%, gemessen an einer 1 mm dicken Aluminiumschicht. Zudem können bei den Versuchen mittels Röntgenvorgang viele Störfaktoren die vollständige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinflusst haben.¹⁰³ Um eine Verbesserung der Opazität zu erreichen, müssten dem experimentell hergestellten Komposit ein röntgenopaker Zusatz, wie beispielsweise Bariumsulfat oder Zirkonoxid, hinzugefügt werden, um einen stärkeren Kontrast zwischen Zahn und Füllungsmaterial zu erreichen.

Weiterhin wurde ein Test zur Untersuchung der Demineralisations- und Remineralisationsfähigkeit der Komposite durchgeführt. Mittels Radiographie kann der Mineralgehalt von Zähnen getestet werden.¹⁰⁴ In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine Demineralisation der Prüfkörper im entsprechenden Medium eintreten kann, was auch in einer REM-Aufnahme bestätigt wurde. Eine Remineralisation trat jedoch nicht ein. Daraus könnte man schlussfolgern, dass an der Oberfläche des Prüfkörpers Partikel des Calciumalkaliphosphats in Lösung gehen und eventuell dadurch ihre antibakterielle Wirkung in der direkten Umgebung der Kompositoberfläche entfalten können. Eine Demineralisation der Zahnhartsubstanz, beispielsweise durch Fruchtsäuren verursacht, kann bereits als Vorstufe des Kariesbefalls angesehen werden. Sie findet normalerweise an den Schmelzarealen des Zahnes durch Säureeinwirkung statt, was eine Vergrößerung der Oberfläche bewirkt. Durch Säure wird der Apatit protonisiert, mit Beenden der Säureeinwirkung lässt auch der Einfluss der Protonen auf die Zahnhartsubstanz wieder nach. Eine Remineralisation wird durch eine hohe Konzentration von Calcium-, Phosphat- und Hydroxylionen erreicht.^{105,106} Bei der Kompositfläche jedoch könnte die Demineralisierung Anzeichen dafür, dass sich Mineralien aus der Oberfläche lösen, um so ihre Wirkung zu entfalten. Durch Abrasion könnten weitere Strukturen freigelegt werden. Dies wiederum stellt keine wünschenswerte Eigenschaft für Komposite dar und könnte zur vereinfachten Bakterienfilmanheftung an den freigelegten, nicht mehr glatt polierten Stellen führen und die Stabilität negativ beeinflussen. Interessant wäre deshalb eine Untersuchung dieser Vorgänge direkt am Füllungsrand und somit

Übergang der Zahnhartsubstanz zum Komposit. Sollte sich herausstellen, dass die antibakterielle Eigenschaft nur in Verbindung mit hoher Abrasion zustande kommt, käme nur eine kurzzeitige Anwendung der Materialien, etwa als temporäre Füllung im Seitenzahnbereich in Frage. Hierzu müßten weiterführende Tests der Abrasionsfestigkeit, aber auch Zugfestigkeit oder Druckfestigkeit durchgeführt werden. Auch die Bestimmung der Härte mittels der Vickershärtemessung oder nach Knoop könnte eine ergänzende Untersuchung darstellen.¹⁰⁷ Soll das Komposit klinisch anwendbar gemacht werden, müssen unter anderem eine ausreichende Röntgenopazität, ästhetische ansprechende Farbmöglichkeiten und Farbbeständigkeit, Beständigkeit gegen Wasseraufnahme und Korrosion gewährleistet werden. Ebenso ist die Messung der Polymerisationsschrumpfung für die Qualität eines Komposits entscheidend, da es durch zu hohe Werte zu Spannungsbildung und Randspaltbildung des Materials kommen kann.¹⁰⁸

5.5 Bedeutung für die Klinik

Sollten nun die Materialeigenschaften der Calciumalkaliphosphat dotierten Komposite den Anforderungen an einen dentalen Füllungswerkstoff erfüllen, könnte er für Füllungen aller Kavitäten-Klassen (I-V) genutzt werden. Sollte eine zu niedrige Abrasionsfestigkeit vorliegen, so könnte das Komposit der kurzfristigen Anwendung dienen. Hier könnte es als Befestigungskomposit für Brackets oder provisorisches Füllungsmaterial im bleibenden Gebiss. Auch bei der Füllungstherapie im Milchgebiss könnte es zur Anwendung kommen, da hier eine physiologisch stärkere Abrasion als im bleibenden Gebiss stattfindet. Die Abrasion des Komposits sollte dabei der Abrasion des Zahnschmelzes entsprechen.¹⁰⁹ Somit könnte die antimikrobielle Wirkung durch Freilegen neuer Strukturen in der Füllung aufrecht erhalten werden. Zudem ist die Liegedauer absehbar. Im Vorversuch mit PMMA wurde ebenfalls eine Bakterienreduktion aufgezeigt. Anwendungsbereiche wären hier etwa herausnehmbare Apparaturen in der Kieferorthopädie oder Interimsversorgungen in der Prothetik, die jeweils eine definierte Tragedauer aufweisen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand der Arbeit war die Herstellung und Untersuchung von antimikrobiell wirksamen Kompositen mit alkalidotierten Calciumphosphat-Füllstoffen. Hierzu wurden Prüfkörper aus PMMA bzw. aus Bis-GMA/TEGDMA-Matrix hergestellt und mit mechanisch aktiviertem CaKPO_4 , CaNaPO_4 oder $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ versetzt. Im Vorversuch wurde zunächst der Agardiffusionstest mit PMMA-Prüfkörpern zur Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung verwendet, der wahrscheinlich aufgrund der mangelnden Auslösung antimikrobiell wirksamer Substanzen keinen Hemmhof zeigte. Deshalb wurde der WST-1-Test angewandt, um die Wirkung direkt an der Oberfläche der Prüfkörper zu testen. Dieser zeigte, dass bei den mit Bakterien beimpften Prüfkörpern eine antimikrobielle Wirkung eintrat, die mittels des Farbstoffumschlags von Formazan im ELISA-Reader quantitativ ausgewertet werden konnte. Zu den verwendeten Kulturen zählten sowohl medizinisch als auch zahnmedizinisch bedeutsame Bakterien wie beispielsweise *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus mutans*. Die Calciumalkaliphosphat dotierten Komposit-Prüfkörper zeigten hierbei eine deutliche Bakterienreduktion. Konstant war die gemessene Bakterienreduktion mit etwa 50-60% für den Plaquemix, bzw. bezogen auf den Zusatz bei CaNaPO_4 . Die besten Ergebnisse lieferten die Tests mit *Staphylococcus aureus* bei der Zugabe von CaKPO_4 mit fast 80% Bakterienreduktion. Die geringste Reduktion trat bei *Streptococcus mutans* mit der Zugabe von CaKPO_4 mit etwa 35% auf.

Bezüglich der materialtechnischen Eigenschaften ergaben sich für die Komposite 3-Punkt-Biegefestigkeiten zwischen 55 und 64 MPa und eine mittels Raman-Spektroskopie bestimmte Konversionsrate für die Komposite mit $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ von 64% und CaNaPO_4 von 66%. Das CaKPO_4 dotierte Komposit erreichte hingegen nur einen Wert von etwa 45%. Die Röntgenopazität der Materialien, gemessen gegen eine 1mm dicke Aluminiumschicht, war mit etwa 60-70% gering.

Die antibakterielle Wirkungsweise der aktivierten Calciumalkaliphosphate liegt vermutlich begründet in einem lokal begrenzten pH-Wert-Anstieg durch $(\text{PO}_4)^{3-}$ Freisetzung in direkter Umgebung der Kompositoberfläche, wodurch ein Zelltod

der Bakterien eintritt. Zusätzlich könnten Ca^{2+} , Na^{2+} und K^+ , die an der Kompositoberfläche freigesetzt werden, den osmotischen Druck lokal angeheben und somit die Bakterienaktivität hemmen.

Aufbauend auf den vorliegenden Ergebnissen könnten weitere Forschung und Verbesserungen der Eigenschaften von Calciumalkaliphosphat dotierten Kompositen angestrebt werden. Diese könnten eingesetzt werden, wenn die Liegedauer zeitlich begrenzt wäre, da nur die hohe Abrasion der Füllungsoberfläche eine dauerhaft antibakterielle Wirkung gewährleistet. Hier wären Komposite zur Befestigung von Brackets, als Füllungsmaterial in der Kinderzahnheilkunde oder zur provisorischen Anwendung denkbar. Auch das Calciumalkaliphosphat dotierte PMMA könnte in Geräten zur kieferorthopädischen Behandlung oder Interimsprothesen genutzt werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Hellwege K.-D., *Die Praxis der zahnmedizinischen Prophylaxe*, Georg Thieme Verlag, 6. Auflage: 1-17 (2003)
- 2 Hannig M., Joiner A., *The structure, function and properties of the acquired pellicle*, Duckworth R.M. (ed), Monograph in Oral Science 19: 29-64 (2006)
- 3 Takahashi N., Nyvad B., *Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process*, Caries Research 42:409-418 (2008)
- 4 Feahterstone J.D.B., *The science and practice of caries*, The Journal of the American Dental Association 131:887-899 (2000)
- 5 Micheelis, W., Schiffner, U., *Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Neue Ergebnisse zu oralen Erkrankungsprävalenzen, Risikogruppen und zum zahnärztlichen Versorgungsgrad in Deutschland 2005*, Deutscher Zahnärzte Verlag (2006)
- 6 Pieper K., Jablonski-Momeni A., *Prävalenz der Milchzahnkaries in Deutschland Die aktuelle Herausforderung angesichts generell erfolgreicher Karies-Prophylaxe bei Kindern und Jugendlichen*, Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkunde 30:6-10 (2008)
- 7 Mullen J., *History of Water Fluoridation*, British Dental Journal, 199: 1-4 (2005)
- 8 Gladys S., Van Meerbeek B., Lambrechts P., Vanherle G., *Microleakage of adhesive restorative materials*, American Journal of Dentistry 14:170-176 (2001)
- 9 Mjör I. A., *Clinical diagnosis of recurrent Caries*, The Journal of the American Dental Association 136 (10):1426-1433 (2005)
- 10 Roulet J.-F., *Benefits and disadvantages of tooth-coloured alternatives to amalgam*, Journal of Dentistry 25 (6):459–473 (1997)
- 11 Bowen R.L., *Dental filling material comprising vinyl silane treated fused silica and a binder consisting of the reaction product of Bis phenol and glycidyl acrylate*, US patent 30,066,112 (1962)
- 12 Pallesen U., Qvist V., *Composite resin fillings and inlays. An 11-year evaluation*, Clinical Oral Investigations 7:71–79 (2003)
- 13 O'Brien W.J., *Dental materials and their selection*, Quintessenz Verlag, 4. Auflage: 224-133 (2008)
- 14 Ilie, N., Kunzelmann, K.-H., Kickerl, R., *Werkstoffkundliche Untersuchungen zu Kompositen*, Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift 60: 321-334 (2005)
- 15 Lutz F., Phillips R. W., *A classification and evaluation of composite resin Systems*, Journal of Prosthetic Dentistry 50: 480-488 (1983)

- 16 Geurtsen W., *Kunststofffüllung*, Urban & Schwarzenberg, 3.Auflage: 165-203 (1992)
- 17 Swartz M.L., Philips R.D., Norman R.D., Eliason S., Rhodes B.F., Clark H.E., *Addition of fluoride to pit and fissure sealant- a feasibility study*, Journal of Dental Research 55 (5): 757-771 (1976)
- 18 Yamamoto K., Ohashi S., Aono M., Kokubo T., Yamada I., Yamauchi J., *Antibacterial activity of silver ions implanted in SiO₂ filler on oral streptococci*, Dental Materials 12: 227-229 (1996)
- 19 Imazato S., McCabe J. F., *Antibacterial activity of MDPB polymer incorporated in dental resin*, Dental Materials 23 (3): 177-182 (1995)
- 20 Imazato S. TM, Tsuchitani Y., McCabe J. F., Russell R. R., *Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite*, Journal of Dental Research 73: 1437-1441 (1994)
- 21 Eichler M., Katzur V., Scheideler L., Haupt M., Geis-Gerstorfer J., Schmalz G. et al., *The impact of dendrimer-grafted modifications to model silicon surfaces on protein adsorption and bacterial adhesion*, Biomaterials 32(35):9168-9179 (2011)
- 22 Gbureck U., Knappe O., Grover L.M., Barralet J.E., *Antimicrobial properties of potassium and sodium substituted Calcium Phosphate Cements*, Biomaterials 26: 6880-6886 (2005)
- 23 Ewald A., Hösel D., Patel S., Grover L.M. , Barralet J. E., Gbureck U., *Silver-doped calcium phosphate cements with antimicrobial activity*, Acta Biomaterialia 7:4064–4070 (2011)
- 24 Aas J.A., Paster B. J., Stokes L. N. et al, *Defining the normal bacterial flora of the oral cavity*, Journal of Clinical Microbiology 43:5721–5732 (2005)
- 25 Samaranayake L.P., *Normal oral flora, the oral ecosystem and plaque biofilm. Essential microbiology for dentistry*, Elsevier. 255–266 (2006)
- 26 Parahitiyawa N.B., Scully C., Leung W. K., Yam W.C., Jin L.J., Samaranayake L.P., *Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions*, Oral Diseases 16:136–145 (2010)
- 27 Gibbons R.J., *Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases*, Journal of Dental Research, 68 (5): 750-760 (1989)
- 28 Hay D.I., *The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite*, Archives of Oral Biology 18:1517-1529 (1973)
- 29 Vassilakos N., Arnebrant T., Glantz P.O., *Adsorption of whole saliva onto hydrophilic and hydrophobic solid surfaces: influence of concentration, ionic strength and pH*, Scandinavia Journal of Dental Resaerch 100: 346-353 (1992)
- 30 Skjorland KK, Rykke M, Sønju T: *Rate of pellicle formation in vivo*, Acta Odontologica Scandinavica 53, 358-362 (1995)
- 31 Pitout J.D.D., Laupland K.B., *Extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae; an emerging public health concern*, The Lancet Infectious Disaeses 8: 159–166 (2008)

- 32 Enright M. C., Robinson D. A., Randle G., Feil E.J., Grundmann H., Spratt B. G., *The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*, Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America 99(11): 7687-7692 (2002)
- 33 Schierholz J.M., Beuth J., *Implant infections: a haven for opportunistic bacteria*, Journal of Hospital Infections 49: 87–93 (2001)
- 34 Hahn H., Kaufmann S. H. E., Schulz T.F., Suerbaum S.: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer Verlag, 6. Auflage: 166-171 (2009)
- 35 Lüllmann H., Mohr K., Hein L., *Pharmakologie und Toxikologie*, Georg Thieme Verlag, 15. Auflage: 433-464 (2003)
- 36 American Academy of Periodontology, *Parameter on aggressive Periodontitis*, Journal of Periodontology 71: 867-869 (2000)
- 37 Beikler T., Karch H., Flemmig T.F., *Adjuvante Antibiotika in der Parodontitistherapie*, Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift 58: 263-265 (2003)
- 38 Gilbert P., Das J., Foley I., *Biofilm susceptibility to antimicrobials*, Advances in Dental Research 11: 160-167 (1997)
- 39 Slots J., Jorgensen M. G., *Effective, safe, practical and affordable Periodontal antimicrobial therapy: where are we going, and are we there yet?*, Journal of Periodontology 28: 298-312 (2000)
- 40 van Winkelhoff A.J., Rodenburg J.P., Goené R.J., Abbas F., Winkle E.G., de Graaff J., *Metronidazole plus amoxicillin in the treatment of Actinobacillus actinomycetemcomitans associated periodontitis*, Journal of Clinical Periodontology 16: 128-131 (1989)
- 41 Peterson L.J., *Contemporary management of deep infections of the neck*, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 51(3):226-231 (1993)
- 42 Adam D., Gahl K., v. Graevenitz H., Horstkotte D., Kraus F, Lode H., Niebel J., Peters G., Ruckdeschel G., Schumacher G., Struck E., Werdan K., *Revidierte Empfehlungen zur Prophylaxe der Bakterieller Endokarditiden*. Zeitschrift für Kardiologie 87: 566–568 (1998)
- 43 Reichl F.-X., Mohr K., Hein L., Hickel R., *Taschenatlas der Pharmakologie und Toxikologie für Zahnmediziner*, Georg Thieme Verlag, 6. Auflage: 144-157 (2007)
- 44 Vogt S., Kühn K.-D., Gopp U., Schnabelrauch M., *Resorbable Antibiotic Coatings for Bone Substitutes and Implantable Devices*, Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, 36 (12): 814–819 (2005)
- 45 Cate J.M., Marsh P.D., *Procedures for establishing efficacy of antimicrobial agents for chemotherapeutic caries prevention*, Journal of Dental Research, 73: 695-703 (1994)

- 46 Eckert R., Qui F., Yarbrough D. K., He J., Anderson M. H., Shi W., *Targeted Killing of Streptococcus mutans by a Pheromone-Guided "Smart"*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50(11): 3651-3657 (2006)
- 47 Sullivan R., Santarpia P., Lavender S., Gittins E., Liu Z., Anderson M.H., He J., Shi W., Eckert R., *Clinical efficacy of a specifically targeted antimicrobial peptide mouth rinse: Targeted elimination of Streptococcus mutans and prevention of demineralization*, Caries Research 45: 415–428 (2011)
- 48 Taubman M.A., Smith D.J., *Effects of local immunisation with streptococcus mutans on induction of salivary immunoglobulin A antibody and experimental caries in rats*, Infection and Immunity 9 (6): 1079-1091 (1974)
- 49 Krüger C., Pearson S.K., Kodama Y., Vacca Smith A., Bowen W.H., Hammarstrom L., *The effects of egg-derived antibodies to glucosyltransferases on dental caries in rats.*, Caries Research 38: 9-14 (2004)
- 50 Ahmad I. A., *Rubber dam usage for endodontic treatment: a review*, International Endodontic Journal 42: 963–972 (2009)
- 51 Martin H., *Cleanliness, disinfection, and sterilization of the root canal*, Current Opinion in Dentistry 1(6): 734-736 (1991)
- 52 Siqueira Junior J.F., *Strategies to treat infected root canals*, Journal of the California Dental Association, 29: 825-837 (2001)
- 53 Lang H., *Kariesprotektive Zusätze in der Adhäsivtechnik*, Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift 59 (7): 368-370 (2004)
- 54 Schmalz G. Arenholt-Bindslev D., *Biokompatibilität zahnärztlicher Werkstoffe*, Urban & Fischer, 100-117 (2005)
- 55 Staehle H.J., Pioch T., *Antimicrobial efficacy and alkalizing effect of different calcium hydroxide compounds*, Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift 44(5): 344-348 (1989)
- 56 Vokus R.P., Cisneros G.J., Levi M., *Antibacterial properties of current orthodontic band cements*, Pediatric Dentistry 20(1): 43-48 (1991)
- 57 Mickel A.K, Wright E.R., *Growth inhibition of Streptococcus anginosus (milleri) by three calcium hydroxide sealers and one zinc oxide-eugenol sealer*, Journal of Endodontics 25(1): 34-37 (1999)
- 58 Coogan M.M., Creaven P.J. *Antibacterial properties of eight dental cements*, International Endodontic Journal 26(6): 355-361 (1993)
- 59 Siqueira J.F.Jr., Lopes H.P., *Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review*, International Endodontic Journal 32 (5): 361-369 (1999)

- 60 Munukka E., Lepparanta O., Korkeamaki M., Vaahtio M., Peltola T., Zhang D., Hupa L., Ylänen H., Salonen J. I., Viljanen M. K., Eerola E., *Bactericidal effects of bioactive glasses on clinically important aerobic bacteria*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine 19(1): 27-32 (2008)
- 61 Nery E.B. LeGeros R.Z., Lynch K.L., Lee K., *Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/bTCP in periodontal osseous defects*, Journal of Clinical Periodontology 63: 729-735 (1992)
- 62 Stoor P., Soderling E., Salonen J.I., *Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms*, Acta Odontologica Scandinavica 56(3): 161-165 (1998)
- 63 Hamilton I.R., *Biochemical effects of fluoride on oral bacteria*, Journal of Dental Research 69:660-667 (1990)
- 64 Stößer L., Heinrich-Weltzien R., *Kariesprävention mit Fluoriden, Teil II: klinische Applikationsformen der Fluoride sowie Fluorid-Stoffwechsel und Toxikologie*. Oralprophylaxe und Kinderzahnheilkunde 29: 65-70 (2007)
- 65 Wiegand A., Buchalla W., Attin T., *Review on fluoride-releasing restorative materials - Fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation*, Dental Materials 23 (3): 343-362 (2007)
- 66 Dijkman GE., Arends J.: *Secondary caries in situ around fluoride-releasing light-curing composites: a quantitative model investigation on four materials with a fluoride content between 0 and 26 vol %*, Caries Research 26: 351-357 (1992)
- 67 Dijkman G.E., de Vries.J., Arends J., *Effect of glutardialdehyde on secondary Caries in situ*, Caries Research 26(4): 293-298 (1992)
- 68 Fraga R.C., Siqueira J.F., Jr., de Uzeda M., *In vitro evaluation of antibacterial effects of photo-cured glass ionomer liners and dentin bonding agents during setting*, Journal of Prosthetic Dentistry 76(5):483-6 (1996)
- 69 Zhou J., Tan J., Chen L. , Li b D., Tan Y., *The incorporation of chlorhexidine in a two-step self-etching adhesive preserves dentin bond in vitro*, Journal of Dentistry 37: 807-812 (2009)
- 70 Cohen M.S., Stern J.M., Vanni A.J., Kelley R.S., Baumgart E., Field D., Libertino J.A, Summerhayes I.C., *In vitro analysis of a nanocrystalline silver-coated surgical mesh*, Surgical Infections 8(3): 397-403 (2007)
- 71 Yoshida K., Tanagawa M., Atsuta M., *Characterization and inhibitory effect of antibacterial dental resin composites incorporating silver- supported materials*, Journal of Biomedical Materials Research 47(4): 516 - 522 (1999)
- 72 Park M.S., Eanes E.D., Antonucci J.M., Skrtic D., *Mechanical properties of bioactive amorphous calcium phosphate/methacrylate composites*, Dental Materials 14: 137-141 (1998)
- 73 Schmalz G., Ergücü Z., Hiller K.A., *Effect of dentin on the antibacterial activity of dentin bonding agents*, Journal of Endodontics 30(5): 352-358 (2004)

- 74 Imazato S., Torii M., Tsuchitani Y., McCabe J. F., Russell RRB, *Incorporation of Bacterial Inhibitor into Resin Composite*, Journal of Dental Research 73(8): 1437-1443 (1994)
- 75 Gbureck U., Thull R., Barralet J. E., *Alkali ion substituted calcium phosphate cement formation from mechanically activated reactants*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine 16 (5): 423-427 (2005)
- 76 Oelschlaeger T.A., Tall B.D., *Invasion of cultured human epithelial cells by Klebsiella pneumonia isolated from the urinary tract*, Infection and Immunity 65(7): 2950-2958 (1997)
- 77 Saha D., Bal M., *Transformation and expression of a staphylococcal plasmid in Escherichia coli*, FEMS Microbiology Letters 109: 279-282 (1993)
- 78 Tebbe D., Thull R., Gbureck U., *Correlation between heparin release and polymerization degree of organically modified silica ceramics from 3-methacryloxypropylpolysilsesquioxane*, Acta Biomaterialia 3: 829-837 (2007)
- 79 Monova A., *Effekte unterschiedlicher Konzentrationen einer kalziumhaltigen Salzhydratschmelze auf das erosive Potential säurehaltiger Getränke*, Dissertation Universität Würzburg (2011)
- 80 Rosentritt M., Hahnel S., Groger G., Muhlfriedel B., Burgers R., Handel G., *Adhesion of Streptococcus mutans to various dental materials in a laminar flow chamber system*, Journal of Biomedical Materials Research: Part B Applied Biomaterials 86 (1): 36-44 (2008)
- 81 Ahn S.J., Lee S.J., Kook J.K., Lim, B.S. *Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles*, Dental Materials, 25 : 206-213 (2009)
- 82 Craig R.G., *Restorative dental materials*, St. Louis, Mosby, 204-207 (1993)
- 83 Gbureck U., Barralet J.E., Hofmann M.P., Thull R., *Nanocrystalline Tetracalcium Phosphate Cement*, Journal of Dental Research 83(5): 425-428 (2004)
- 84 Driessens F.C.M., Boltong M.G., de Maeyer E.A.P., Wenz R. Nies B., Planell J.A., *The Ca/P range of nanopartic calcium phosphate cements*, Biomaterials 23(19): 4011-4017 (2002)
- 85 Athanassiadis B., Abbott P.V., Walsh L.J., *The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics*, Austrian Dental Journal 52(1): 64-82 (2007)
- 86 Stoor P., Söderling E., Salonen J.I., *Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms*, Acta Odontologica Scandinavica 56: 161-165 (1998)
- 87 Gbureck U., Groms O., Grover L.M., Barralet J.E., Thull R., *Mechanical activation of β - Tricalcium phosphate and cement formation wit Na_2HPO_4 solution*, Biomaterials 24: 4123- 4131 (2003)

- 88 Schmalz G., *Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials - advantages and limitations*, Journal of Dentistry 22: 6-11 (1994)
- 89 Antranikian G., *Angewandte Mikrobiologie*, Springer Verlag, 1. Auflage: 53-55 (2005)
- 90 Cheng L., Zhang K., Melo M.A.S., Weir M.D., Zhou X.D., Xu H.H.K., *Anti-biofilm dentin primer with quaternary ammonium and silver nanoparticles*, Journal of Dental Research 91: 598-604 (2012)
- 91 Ahl T., Reinholdt J., *Detection of immunoglobulin A1 protease-induced Fab alpha fragments on dental plaque bacteria*, Infection and Immunity 59(2): 563-569 (1991)
- 92 Kawashima M, Hanada N, Hamada T, Tagami J, Senpuku H., *Real-time interaction of oral streptococci with human salivary components*, Oral Microbiology and Immunology 18(4): 220-225 (2003)
- 93 Beyth N., Hourri-Haddad Y., Baraness-Hadar L., Yudovin-Farber I., Dombb A. J., Weiss E. I., *Surface antimicrobial activity and biocompatibility of incorporated polyethylenimine nanoparticles*, Biomaterials 29: 4157-4163 (2008)
- 94 Li F., Chen J. , Chai Z., Zhang L., Xiao Y., Fang M., Ma S., *Effects of a dental adhesive incorporating antibacterial monomer on the growth, adherence and membrane integrity of Streptococcus mutans*, Journal of dentistry 37: 289-296 (2009)
- 95 Schmidt R.F., Lang F., Thews G., *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, Springer Verlag, 29. Auflage: 848 (2005)
- 96 Sreebny L.M., *Saliva in health and disease: an appraisal and update*, International Dental Journal 50: 140-161 (2000)
- 97 Bertoluzza A., Fagnano C., Monti P., Simoni R., Tinti A., Tosi M. R., Caramazza R., *Raman spectroscopy in the study of biocompatibility*, Clinical Materials 9(1): 49-68 (1992)
- 98 Schmitt M., Popp J., *Raman spectroscopy at the beginning of the twenty-first century*, Journal of Raman Spectroscopy 37: 20-28 (2006)
- 99 Ruyter I.E., *Methacrylate-based polymeric dental materials: conversion and related Properties*, Acta Odontologica Scandinavica, 40(5): 359-376 (1982)
- 100 Ferracane J.L., *Elution of leachable components from composites*, Journal of Oral Rehabilitation 21(4): 441-452 (1994)
- 101 Chung K.H., *The relationship between composition and properties of posterior resin composites*, Journal of Dental Research 69 (3): 852-856 (1990)
- 102 Gängler P., Hoffmann T., Willershausen B., Schwenzer N., Ehrenfeld M., *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie*, Thieme Verlag, 3. Auflage: 183 (2010)

- 103 Vieth G., *Belichten und Entwickeln photographischer Schichten für Messzwecke*, Technisches Messen 48: 131-138 (1981)
- 104 Klinger H.G., Wiedemann W., *A method for radiographic longitudinal study of mineral content during in vitro demineralization and remineralization of human tooth enamel*, Archives of Oral Biology 30(4): 373-375 (1985)
- 105 Nunn J.H., *Prevalence of dental erosion and the implications for oral health*, European Journal of Oral Science 104: 156-161 (1996)
- 106 Young A., Tenuta L.M.A., *Initial Erosion Models*, Caries Research 45: 33-42 (2011)
- 107 Manhart J., Kunzelmann K.H., Chen H.Y., Hickel R., *Mechanical properties of new composite restorative materials*, Journal of Biomedical Material Research 53(4): 353-361 (2000)
- 108 Soltesz U., Koplín C., *Polymerisationsschrumpfung neuer Komposit-Füllungswerkstoffe*, Zahnärztliche Mitteilungen 8: 54-60 (2004)
- 109 Van Waes, H.: *Füllungstherapie kariöser Milchmolaren: Materialien und Methoden*, Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin 103: 947-955 (1993)

Danksagung

Danken möchte ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. Uwe Gbureck für die Überlassung des Promotionsthemas und die stets geduldige Betreuung.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. Andrea Ewald für die gute und herzliche Betreuung.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Ulrich Vogel für die Übernahme des Korreferates und die damit verbundenen Mühen.

Auch möchte ich mich bei Frau Isabell Biermann bedanken, die mir von Anfang an im Labor eine große Hilfe war und Herrn Wolf (Lupi) Herzlieb, der mir bei den Versuchen zu den materialtechnischen Eigenschaften mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Ursula Rummel, Frau Rita Schmid und Frau Helga Dittrich für die nette Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Und zu guter Letzt: Vielen Dank an meine Familie, die mich während der Studienzeit und darüber hinaus immer unterstützt hat, an meine Freunde und Tobias.