

**Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**Neue antimikrobielle Strategien als Ansatz zur Bekämpfung
Biofilm-assoziiierter Erkrankungen der Mundhöhle:
materialkundliche, mikrobiologische und klinische Aspekte**

Habilitation

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dr. med. dent. Maximilian Manuel Kollmuß

aus München

2022

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	3
2.	Eigene Arbeiten	7
2.1.	Untersuchung der Plaqueakkumulation auf verschiedenen dentalen Werkstoffen und Restaurationsmaterialien	7
2.1.1.	Originalarbeit: Differences in radiopacity, surface properties and plaque accumulation for CAD/CAM fabricated vs. conventionally processed polymer-based temporary materials	9
2.1.2.	Originalarbeit: Elution behavior of a 3D-printed, milled and conventional resin-based occlusal splint material	11
2.1.3.	Originalarbeit: Intranuclear cell uptake and toxicity of titanium dioxide and zirconia particles as well as bacterial adhesion on dental titanium- and zirconia-implants	13
2.1.4.	Originalarbeit: A comprehensive in vitro comparison of the biological and physicochemical properties of bioactive root canal sealers.....	15
2.2.	Neue Methoden zur Therapie Biofilm-assoziiertes Erkrankungen der Mundhöhle	17
2.2.1.	Originalarbeit: Antimicrobial effect of gaseous and aqueous ozone on caries pathogen microorganisms grown in biofilms	19
2.2.2.	Originalarbeit: Comparison of ozone gas and sodium hypochlorite/chlorhexidine two-visit disinfection protocols in treating apical periodontitis: a randomized controlled clinical trial	20
2.2.3.	Originalarbeit: Effect of Polyhexanide as Antiseptic Mouth Rinse against Oral Pathogens in an In Vitro Biofilm Model	22
2.2.4.	Originalarbeit: Sensitivity of caries pathogens to antimicrobial peptides related to caries risk	24
2.2.5.	Originalarbeit: Inhibitory effect of LL-37 and human lactoferricin on growth and biofilm formation of anaerobes associated with oral diseases.....	26
2.2.6.	Originalarbeit: Targeting antibiotic tolerance in anaerobic biofilms associated with oral diseases: Human antimicrobial peptides LL-37 and lactoferricin enhance the antibiotic efficacy of amoxicillin, clindamycin and metronidazole	27
3.	Diskussion.....	29
4.	Zusammenfassung	43
5.	Literaturverzeichnis	47
6.	Danksagung.....	51

1. Einleitung

Seit den 1980er Jahren geraten Biofilm-assoziierte infektiöse Erkrankungen immer mehr in den Fokus verschiedener medizinischer Fachrichtungen (10, 15). Der Hauptursache dafür ist, dass in einem Biofilm organisierte Mikroorganismen mit den klassischen antimikrobiellen Therapieansätzen deutlich schwieriger unter Kontrolle gebracht werden können. Dies ist bedingt durch verschiedene Mechanismen, die teilweise noch nicht vollständig verstanden sind und daher einen bedeutenden Schwerpunkt der mikrobiologischen Forschung darstellen (16). Seit einigen Jahren ist bekannt, dass es innerhalb eines Biofilmverbunds von Mikroorganismen zu einem vielfältigen Austausch von Informationen, sowohl innerhalb der Zellen einer Spezies, als auch zwischen Zellen unterschiedlicher Spezies kommt. Dieses als „quorum sensing“ bezeichnete Phänomen trägt maßgeblich dazu bei, Resistenzgene weiterzugeben und metabolische Anpassungen innerhalb des Biofilmverbunds zu steuern (13). Zudem liegen die einzelnen Mikroorganismen in einem Biofilm nicht „frei“ vor, sondern eingebettet in eine extrazelluläre Matrix aus Polysacchariden, Proteinen und Nukleinsäuren. Durch diese Einbettung in einen Biofilm kommt zu unterschiedlichen Anpassungen des bakteriellen Stoffwechsels, was zu einer gravierenden Änderung des Verhaltens führen kann. Generell kommt es häufig zu einem Abfall der metabolischen Aktivität der Mikroorganismen, was eine Bekämpfung mit vielen Antibiotika-Klassen zusätzlich erschwert, da diese oftmals auf einen hohen Zellmetabolismus der Zielzelle angewiesen sind (28). Aus diesen Gründen sind Antibiotika in vielen Fällen nicht in der Lage, eine Biofilm-assoziierte Infektion mit ausreichender Effektivität zu behandeln. Daher wird seit einiger Zeit intensiv nach neuen Strategien zur Behandlung solcher Krankheitsbilder gesucht.

Gerade in der Zahnmedizin spielen bakterielle Biofilme eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der beiden Hauptkrankheitsbilder Karies und Parodontitis, von denen weltweit Millionen von Menschen betroffen sind (36, 37). So erfolgte sogar die Erstbeschreibung eines

bakteriellen Biofilms im 17. Jahrhundert anhand einer an sich selbst entnommenen Plaqueprobe von den Zähnen und deren lichtmikroskopischer Untersuchung (27). Karies und Parodontitis können als Infektionskrankheiten klassifiziert werden, obwohl viele weitere Faktoren bei der Entstehung und Ausprägung der Krankheitsbilder wichtige Rollen spielen (44). So sind die Ernährungsgewohnheiten in Zusammenschau mit der individuellen Mundhygiene eines Patienten neben der mikrobiologischen Komponente wichtige Faktoren, die in der Entwicklung kariöser Läsionen entscheidend sind. Bei Parodontalerkrankungen spielt zusätzlich das Immunsystem des Patienten und dessen Reaktion auf den im subgingivalen Bereich gelegenen Biofilm eine entscheidende Rolle im Hinblick auf das Ausmaß und die Schwere der Destruktion der parodontalen Gewebe. Diese häufigen Krankheitsbilder mit teilweise oder vollständigem Verlust von Zähnen machen restaurative und prothetische Maßnahmen zur Rehabilitation der Gebissituation notwendig. Die in den letzten Jahren einsetzende zunehmende Digitalisierung der Zahnmedizin und Zahntechnik führte über die Anwendung moderner CAD/CAM-Systeme zur Entwicklung einer Fülle von neuen Materialien. Die hier verwendeten Materialien treten im feuchten Milieu der Mundhöhle in Kontakt mit den oralen Geweben. Dabei kommt es zu vielfältigen gewünschten und unerwünschten Interaktionen, unter anderem mit den Bakterien des oralen Mikrobioms. Diese genauestens zu kennen ist unerlässlich für einen vorhersagbaren Erfolg einer solchen zahnärztlichen Therapie. Dabei sind neben werkstoffkundlichen Parametern vor allem das biologische Verhalten im Hinblick auf die zellbiologischen Auswirkungen der Materialien und ihre Interaktion mit dem oralen Mikrobiom zu nennen. Gerade bei Materialien, die an der empfindlichen Schnittstelle zwischen Parodontium, Alveolarknochen und Mundhöhle eingesetzt werden (z.B. bei dentalen Implantaten), sind die Anforderungen an die Biokompatibilität besonders hoch.

Ist es bereits zu einer Besiedelung oder Infektion einer Oberfläche gekommen, gibt es verschiedene Möglichkeiten, eine solche Biofilm-Kolonisierung zu bekämpfen. Dabei spielt

die mechanische Entfernung von Biofilmen und infizierten Geweben eine große Rolle. Glücklicherweise sind viele Gebiete der Mundhöhle einer einfachen aktiven Reinigung im Sinne der mechanischen Entfernung des Biofilms zugänglich. Bei schweren Verlaufsformen der Parodontitis oder ungünstigen Bedingungen in der Mundhöhle, wie eine eingeschränkte Fähigkeit zur häuslichen Mundhygiene oder ein verminderter Speichelfluss, kann die alleinige mechanische Entfernung des Biofilms keinen ausreichenden Therapieerfolg sicherstellen. Zusätzlich gibt es beispielsweise bei endodontischen oder parodontalen Infektionen aus anatomischen Gründen Stellen, die einer mechanischen Reinigung nicht, oder nur sehr schwer zugänglich sind. Für all diese Fälle müssen alternative Therapiekonzepte oder antibakteriell wirkende Materialien, die an das jeweilige Krankheitsbild angepasst sind, zum Einsatz kommen. So kann über die Applikation von verschiedenen antimikrobiell wirkenden Spüllösungen oder Substanzen eine chemische Plaquekontrolle zusätzlich zur mechanischen Reinigung zu einer Verbesserung des klinischen Bildes führen.

Im Bereich der Parodontologie sind neben dem adjuvanten Einsatz von klassischen antibiotischen Wirkstoffen auch neue Ansätze mit endogenen antimikrobiellen Peptiden denkbar, die über andere Wirkungsmechanismen als konventionelle Antibiotika verfügen und daher möglicherweise insbesondere bei der Bekämpfung von Biofilmen zum Einsatz kommen könnten (22). Diese kleinen Peptide spielen in vielfältiger Weise eine Rolle bei der angeborenen Abwehr von Mikroorganismen, da sie in vielen Geweben und insbesondere Schleimhäuten exprimiert werden, darunter auch in der Mundhöhle (12). Ein Mangel oder eine vermehrte Expression von antimikrobiellen Peptiden könnte zudem eine mögliche Erklärung für unterschiedliche Krankheitsverläufe sein, was in anderen Bereichen der Medizin, wie beispielsweise der Dermatologie beim Krankheitsbild der Psoriasis bereits bekannt ist (57).

In dieser Arbeit sollen daher verschiedene Aspekte zur Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten von Biofilm-assoziierten Infektionen beleuchtet werden: An erster

Stelle stehen vier Arbeiten zur biologischen Interaktion von dentalen Restaurationsmaterialien mit dem oralen System. Dabei liegt ein Schwerpunkt auf der Untersuchung der Auswirkungen der Materialien auf die Biofilmbildung an deren Oberfläche und die Interaktion mit den Zellen des oralen Systems. Im zweiten Teil der Arbeit sollen anhand von vier Laborstudien unterschiedliche Therapiekonzepte zur Elimination von oralen Biofilmen in verschiedenen Bereichen untersucht werden. Diese Untersuchungen werden durch zwei klinischen Studien auf diesem Gebiet ergänzt.

2. Eigene Arbeiten

2.1. Untersuchung der Plaqueakkumulation auf verschiedenen dentalen Werkstoffen und Restaurationsmaterialien

Die Interaktion von durch den Zahnarzt in die Mundhöhle eingebrachten Materialien mit den umliegenden Geweben und den Mikroorganismen ist geprägt von den besonderen Umgebungsbedingungen der Mundhöhle. So spielt für die Verträglichkeit eines zahnärztlichen Materials neben dessen Biokompatibilität in Bezug auf die umliegenden Gewebe, auch die Affinität der zur Mundhöhle exponierten Oberfläche für orale Mikroorganismen eine wichtige Rolle. Hier ist allerdings zwischen verschiedenen Materialgruppen und Einsatzindikationen zu unterscheiden: Zum einen gilt es die große Gruppe an Restaurationsmaterialien für verloren gegangene Zahnhartsubstanz zu bedenken, welche häufig nur einen indirekten, meist über den Speichel vermittelten Kontakt zu den umliegenden Weichgeweben hat. Zum anderen sind Materialien mit direktem Kontakt zu Schleimhaut und Knochen zu nennen, hierunter fallen beispielsweise auch dentale Implantate, welche an der kritischen Interaktionsstelle von Alveolarknochen, Gingiva und Mundhöhle platziert werden. Generell gilt es ein besonderes Augenmerk auf die langfristige Verträglichkeit der eingesetzten Materialien zu legen. Im Folgenden werden vier Arbeiten vorgestellt, die unterschiedliche Werkstoffe hinsichtlich verschiedener Interaktionsmechanismen in der Mundhöhle untersuchen. Dabei liegt der Schwerpunkt auf modernen, CAD/CAM-basierten Fertigungsstrategien, die sowohl subtraktive als auch additive Verfahren (3D-Druck) beinhalten. Die neuen, für diese Verfahren entwickelten Materialien beruhen teilweise auf anderen Zusammensetzungen, was die Untersuchung der biologischen Eigenschaften erforderlich macht.

Folgende Arbeiten werden hier nun genauer vorgestellt:

Nassary Zadeh P, Lümke N, Eichberger M, Stawarczyk B, **Kollmuss M**. Differences in radiopacity, surface properties and plaque accumulation for CAD/CAM fabricated vs. conventionally processed polymer-based temporary materials. *Oper Dent* 2020 Jul; 45(4):407-415. (IF 2020: 2,027)

Wedekind L, Güth JF, Schweiger J, **Kollmuss M**, Reichl FX, Edelhoff D, Högg C. Elution behavior of a 3D-printed, milled and conventional resin-based occlusal splint material. *Dent Mater* 2021 Apr;37(4):701-710. (IF 2021: 5,687)

Dhein J, Haller C, Reichl FX, Milz S, Hickel R, **Kollmuss M**, Högg C. Intranuclear cell uptake and toxicity of titanium dioxide and zirconia particles as well as bacterial adhesion on dental titanium- and zirconia-implants. *Dent Mater* 2022 Jan 3; S0109-5641(21)00477-2. (IF 2021: 5,687)

Wuersching SN, Diegritz C, Hickel R, Huth KC, **Kollmuss M**. A comprehensive in vitro comparison of the biological and physicochemical properties of bioactive root canal sealers. *Clin Oral Investig* 2022 Oct; 26(10):6209-6222. (IF 2021: 3,607)

2.1.1. Originalarbeit: Differences in radiopacity, surface properties and plaque accumulation for CAD/CAM fabricated vs. conventionally processed polymer-based temporary materials

Zielsetzung: Diese werkstoffkundliche Untersuchung hatte zum Ziel, Unterschiede zwischen verschieden gefertigten Materialien für provisorischen Zahnersatz hinsichtlich Radiopazität, freier Oberflächenenergie, Oberflächenrauigkeit und Plaqueakkumulation zu untersuchen.

Material und Methode: Sechs Materialien (3 CAD/CAM-gefertigt: Art Bloc Temp, Telio CAD, VITA CAD Temp; 3 konventionell gefertigt: Integrity Multi Cure, Luxatemp Automix Plus, Protemp 4) wurden hinsichtlich ihrer Radiopazität nach DIN EN ISO 13116 untersucht. Als Kontrolle diente Zirkonoxid. Die Messung der freien Oberflächenenergie erfolgte durch Kontaktwinkelbestimmungen, die Bestimmung der Oberflächenrauigkeit durch ein Profilometer. Zur Evaluation der Plaqueakkumulation erfolgte die Anzucht eines bakteriellen Biofilms auf der Oberfläche von zylindrischen Probekörpern der Materialien. Hierfür wurden *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* und *Veillonella parvula* verwendet. Die Bestimmung der Plaqueakkumulation erfolgte mittels eines ATP-basierten Lumineszenzassays zur Quantifizierung der Bakterien nach 5 Tagen Inkubation.

Ergebnisse: Es konnte keine Radiopazität für sämtliche CAD/CAM-Materialien als auch für Protemp 4 nachgewiesen werden. Zirkonoxid zeigte eine geringere freie Oberflächenenergie als alle anderen Polymermaterialien mit Ausnahme von Telio CAD. Luxatemp Automix Plus wies eine erhöhte Rauigkeit der Oberfläche im Vergleich zu allen anderen Materialien auf. Hinsichtlich der Plaqueakkumulation zeigte sich ein ähnliches Verhalten aller Materialien, wobei die konventionell gefertigten Materialien tendenziell eine stärkere Biofilmbildung aufwiesen.

Schlussfolgerung: Generell zeigten die CAD/CAM-gefertigten Materialien bessere Ergebnisse hinsichtlich der Oberflächenrauigkeit, der freien Oberflächenenergie und der

Plaueakkumulation auf. Die Radioopazität hingegen war bei keinem der getesteten Materialien außer der Kontrollgruppe Zirkonoxid ausreichend.

Fundstelle: doi: 10.2341/19-057-L.

2.1.2. Originalarbeit: Elution behavior of a 3D-printed, milled and conventional resin-based occlusal splint material

Zielsetzung: Ziel dieser Studie war die Untersuchung und Quantifizierung einer möglichen Freisetzung von Monomeren aus unterschiedlich verarbeiteten Materialien zur Herstellung von Aufbisschienen. Weiterhin sollte die Zytotoxizität der freigesetzten Monomere im Verhältnis der realen Materialmenge in Bezug auf die Größe einer Aufbisschiene untersucht werden.

Material und Methode: Aus den Schienenmaterialien SHERAprint-ortho plus (additiv, 3D-Druck), SHERAeco-disc PM20 (subtraktiv, CAD/CAM) und SHERAORTHOMER (konventionell) wurden zylindrische Probekörper (6 mm Durchmesser, 2 mm Höhe) hergestellt. Es folgte eine Elution in Wasser bzw. als „worst-case-Szenario“ Methanol zur Freisetzung möglicher Monomere. Die Eluate wurden mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) analysiert. Für die Monomere Tetrahydrofurfuryl-Methacrylat (THFMA), 1,4-Butylene-Glycol-Dimethacrylat (BDDMA) und Tripropylenglycol-Diacrylate (TPGDA) wurde ein XTT-Assay zur Evaluation der Zytotoxizität auf Gingivafibroblasten (HGF) durchgeführt. Zur Projektion der gewonnenen Ergebnisse auf die Größe einer realen Aufbisschiene wurde das Volumen und die Oberfläche einer CAD-designten Schiene berechnet.

Ergebnisse: Für SHERAeco-disc PM20 und SHERAORTHOMER konnte keine Monomerelektion in Wasser nachgewiesen werden. SHERAprint-ortho plus eluierte nach 72 h 7,47 µmol/l des Monomers THFMA in Wasser. In Methanol konnten noch sechs weitere (Co)-Monomere und fünf Additive detektiert werden. Der XTT-Test ergab EC₅₀-Konzentrationen von 3006 ± 408 µmol/l für THFMA, 2569.5 ± 308 µmol/l für BDDMA und 596.7 ± 88 µmol/l für TPGDA.

Schlussfolgerung: Im Lösungsmittel Methanol überstieg die Menge an eluierten Monomeren die toxische Dosis für Gingivafibroblasten, wenn die Materialmenge auf eine komplette

Aufbissschiene hochgerechnet wurde. Bei der Verwendung von Wasser als Lösungsmittel, wie es einer klinischen Situation entspricht, trat keine Monomerelution in toxischem Ausmaß auf.

Fundstelle: doi: 10.1016/j.dental.2021.01.024.

2.1.3. Originalarbeit: Intranuclear cell uptake and toxicity of titanium dioxide and zirconia particles as well as bacterial adhesion on dental titanium- and zirconia-implants

Zielsetzung: Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass Partikel von dentalen Titan- und Zirkonimplantaten freigesetzt werden können. In dieser Untersuchung wurden Titandioxid (TiO_2) und Zirkondioxidpartikel (ZrO_2) hinsichtlich ihrer Toxizität und der Aufnahme in den Zellkern getestet. Zusätzlich wurde die Plaqueakkumulation von verschiedenen anaeroben Bakterien auf der Oberfläche von Titan- bzw. Zirkondioxid-Implantaten untersucht.

Material und Methode: Die Zyto- und Genotoxizität von TiO_2 -Mikropartikeln (TiO_2 -MP) und TiO_2 -Nanopartikeln (TiO_2 -NP) wurden in Fibroblasten des parodontalen Ligaments mittels XTT-Test (Zytotoxizität) und Comet-Assay (DNA-Schäden) untersucht. Die Partikelgrößen wurden mittels SEM-Mikroskopie bestimmt. Die intranukleäre Aufnahme der Partikel wurde visuell durch ein konfokales Laserscan-Mikroskop dargestellt. Die Adhäsion der anaeroben Bakterienspezies *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* auf der Oberfläche von Titan- und Zirkonoxidimplantaten wurde nach Extraktion der nach 5 Tagen gebildeten Biofilme durch Auszählen der Kolonie-bildenden Einheiten untersucht.

Ergebnisse: 99% der freigesetzten TiO_2 -Nanopartikel wiesen eine Größe von unter 100 nm, 88% der TiO_2 -Mikropartikel eine Größe zwischen 50 und 200 nm auf. Die EC_{50} Konzentrationen für TiO_2 -MPs betrug 92 mg/l, für TiO_2 -NP 15 mg/l. Bereits bei einer Konzentration von 10% der EC_{50} von TiO_2 -NP konnte eine Zunahme der DNA-Schädigung beobachtet werden. Generell wurden Nanopartikel eher in den Zellkern aufgenommen als Mikropartikel. Die Adhäsion aller Bakterienspezies zeigte sich erhöht bei Titanimplantaten im Vergleich zu Zirkonoxidimplantaten.

Schlussfolgerung: Die Toxizität von Titanpartikeln ist abhängig von ihrer Größe. Generell wiesen Nanopartikel beider Materialien eine größere Toxizität auf, als die jeweiligen Mikropartikel. Aufgrund der geringeren Bakterienadhäsion auf der Oberfläche von Zirkonoxidimplantaten könnte sich ein klinischer Vorteil hinsichtlich einer möglichen Reduktion von biologischen Komplikationen wie Periimplantitis ergeben.

Fundstelle: doi: 10.1016/j.dental.2021.12.142.

2.1.4. Originalarbeit: A comprehensive in vitro comparison of the biological and physicochemical properties of bioactive root canal sealers

Zielsetzung: Ziel dieser Untersuchung war der Vergleich von neuen bioaktiven Wurzelkanalsealern in Hinblick auf ihre Zytotoxizität, antimikrobielle Wirkung und die werkstoffkundlichen Parameter Dichtigkeit, pH-Wert, Fließfähigkeit und Filmdicke.

Material und Methode: Eluate der Sealer GuttaFlow® bioseal (GF), BioRoot™ RCS (BR) and TotalFill® BC Sealer (TF) und als derzeitiger Goldstandard AH plus® (AH) wurden in Zellkulturmedium hergestellt. Humane Fibroblasten des parodontalen Ligaments und humane Osteoblasten wurden mit den Sealereluatens in kubiert. Es folgte eine Bestimmung der Zytotoxizität mittels eines WST-8-Assays und eine Messung der Konzentrationen von IL-6 und PGE₂ zur Evaluation einer möglichen proinflammatorischen Wirkung. Um eine mögliche osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen nachzuweisen, erfolgte eine Inkubation der Zellen mit den Sealereluatens, gefolgt von einer Färbung mit Alizarinrot. Zur Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung erfolgte ein „Direct Contact Test“ mit ausgewählten, häufig bei endodontischen Infektionen vorkommenden Mikroorganismen. Die Messung der Fließfähigkeit, der Filmdicke und des pH-Werts erfolgten nach der derzeit gültigen ISO-Norm. Zur Evaluation der Dichtigkeit einer Wurzelfüllung mit den getesteten Sealern wurde ein Bakterienpenetrationsversuch an extrahierten Zähnen durchgeführt.

Ergebnisse: Es zeigte sich im Vergleich zu AH eine reduzierte Zytotoxizität für die bioaktiven Sealer. Bei den freigesetzten Mengen an IL-6 und PGE₂ wurden für die verschiedenen Materialien unterschiedliche Werte gemessen. BR zeigte als einziges Material eine Einlagerung von Kalzium in den mesenchymalen Stammzellen, was für eine osteogene Differenzierung dieser Zellen spricht. TF und AH wiesen die niedrigste Filmdicke und höchste Fließfähigkeit auf. Alle Sealer zeigten nach 48 h eine gute antimikrobielle Wirksamkeit gegen die getesteten

Mikroorganismen. Das Material BR zeigte nach 28 Tagen die besten Werte hinsichtlich der Dichtigkeit der Wurzelfüllungen.

Schlussfolgerung: Bioaktive Sealer sind gute alternative Materialien für Wurzelfüllungen. Die verschiedenen getesteten Materialien weisen jeweils Stärken und Schwächen in unterschiedlichen Bereichen auf. Darauf sollte bei der klinischen Auswahl der Sealer Rücksicht genommen werden.

Fundstelle: doi: 10.1007/s00784-022-04570-2.

2.2. Neue Methoden zur Therapie Biofilm-assoziiierter Erkrankungen der Mundhöhle

Die in den letzten Jahren rapide gestiegene Zahl der Antibiotikaresistenzen macht es notwendig, alternative Therapiekonzepte zur Bekämpfung bakterieller Infektionen zu finden. Verschiedene Vorgehensweisen sind dabei grundsätzlich denkbar: Zum einen können antimikrobielle Strategien beruhend auf der direkten chemisch-physikalischen Abtötung von Mikroorganismen angewandt werden, zum anderen ist es möglich, neue antimikrobiell wirksame Substanzen zu entwickeln, die eine pharmakologische Wirkung im Körper entfalten. Physikalische Methoden, wie der Einsatz von Ozon haben ihre Stärken in der gezielten Desinfektion von Hartgeweben, wohingegen Spüllösungen mit antibakterieller Wirkung in der gesamten Mundhöhle eingesetzt werden können. Die Zugänglichkeit des infizierten Gewebes spielt dabei eine entscheidende Rolle. So sind beispielsweise viele Bereiche der Zahnoberfläche (z.B. okklusale und bukkale Flächen) für chemische und physikalische Reinigungsprozesse gut zugänglich. Die Applikationstechnik und Anwendung der jeweiligen Methode steht hier im Fokus der Untersuchungen. Im Gegensatz dazu ist ein Erreichen von tieferen oder sehr empfindlichen Gewebeschichten mit diesen Methoden nicht möglich. Hier bietet sich eher die Applikation von antimikrobiellen Substanzen an, die im betroffenen Zielgewebe ihre Wirkung entfalten. Ein vielversprechender Ansatz sind hier die schon beschriebenen antimikrobiellen Peptide. Der Wirkungsmechanismus dieser Peptide beruht auf deren selektiver Interaktion mit der Phospholipidmembran bakterieller Zellen. Durch die Bildung von Poren kommt es zu einem Einstrom von Wasser und in Folge zu einer Lyse der Bakterienzelle. Hier sind verschiedene Mechanismen beschrieben, die in Abhängigkeit von der Struktur des antimikrobiellen Peptids zu der beschriebenen Porenbildung führen. Dieser Wirkungsmechanismus ist möglicherweise in der Lage, die Empfindlichkeit von in Biofilmen organisierten Mikroorganismen für konventionelle Antibiotika zu erhöhen. Im folgenden Abschnitt werden 4 Laborstudien und 2

klinische Studien vorgestellt, die sich mit der Problematik der Diagnostik und Therapie Biofilm-assoziiierter Erkrankungen in unterschiedlicher Weise befassen.

Folgende Veröffentlichungen werden in diesem Teil der Arbeit genauer vorgestellt:

Kollmuss M, Kist S, Obermeier K, Pelka AK, Hickel R, Huth KC. Antimicrobial effect of gaseous and aqueous ozone on caries pathogen microorganisms grown in biofilms. *Am J Dent* 2014 Jun; 27(3):134-138. (IF 2014: 0,850)

Kist S, **Kollmuss M**, Jung J, Schubert S, Hickel R, Huth KC. Comparison of ozone gas and sodium hypochlorite/chlorhexidine two-visit disinfection protocols in treating apical periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Investig* 2017 May; 21(4):995-1005. (IF 2017: 2,386)

Kollmuss M, Tolksdorf K, Wuersching SN, Hickel R, Huth KC. Effect of Polyhexanide as Antiseptic Mouth Rinse against Oral Pathogens in an In Vitro Biofilm Model. *Acta Odontol Scand.* 2021; 15: 1-8. (IF 2021: 2,232)

Goeke JE, Kist S, Schubert S, Hickel R, Huth KC, **Kollmuss M**. Sensitivity of caries pathogens to antimicrobial peptides related to caries risk. *Clin Oral Investig* 2018 Sep; 22(7):2519-2525. (IF 2018: 2,453)

Wuersching SN, Huth KC, Hickel R, **Kollmuss M**. Inhibitory effect of LL-37 and human lactoferricin on growth and biofilm formation of anaerobes associated with oral diseases. *Anaerobe* 2021 Feb; 67:102301. (IF 2021: 2,837)

Wuersching SN, Huth KC, Hickel R, **Kollmuss M**. Targeting antibiotic tolerance in anaerobic biofilms associated with oral diseases: Human antimicrobial peptides LL-37 and lactoferricin enhance the antibiotic efficacy of amoxicillin, clindamycin and metronidazole. *Anaerobe* 2021 Oct; 71:102439. (IF 2021: 2,837)

2.2.1. Originalarbeit: Antimicrobial effect of gaseous and aqueous ozone on caries pathogen microorganisms grown in biofilms

Zielsetzung: Ziel dieser Untersuchung war es, den antimikrobiellen Effekt von Ozongas und ozoniertem Wasser auf kariespathogene Mikroorganismen in einem Biofilmverbund zu testen.

Material und Methode: Es wurden Biofilme der Bakterienspezies *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus mutans* und *Lactobacillus paracasei* auf Nitrozellulose-Membranen angezüchtet. Die in Stücke zerteilten Membranen wurden jeweils für 60 s verschiedenen Konzentrationen von Chlorhexidin (CHX, 0,1%-20%), Ozongas (1-64 g/m³) und ozoniertem Wasser (1,25-20 µg/ml) ausgesetzt. Die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten (CFU/ml) wurde durch Ausplattieren bestimmt und die prozentuale Überlebensrate im Vergleich zur Negativkontrolle (PBS für CHX und ozoniertes Wasser, Umgebungsluft für Ozongas) in Prozent berechnet. Zusätzlich wurden für ausgewählte Konzentrationen der Einfluss der Expositionszeit (30-120 s) untersucht.

Ergebnisse: Es zeigte sich eine gute Wirksamkeit aller drei untersuchten Substanzen mit nahezu vollständiger Elimination der Bakterien jeder Spezies für die höchsten Konzentrationen. Die univariate Varianzanalyse ergab einen signifikanten Einfluss der Konzentration und der Expositionszeit auf die Überlebensrate ($p < 0,0001$, $\eta^2 = 0,281/0,580$)

Schlussfolgerung: Ozongas und ozoniertes Wasser sind mögliche alternative antimikrobielle Substanzen im Einsatz gegen kariespathogene Biofilme mit einem ähnlichen Wirkungsspektrum wie Chlorhexidin. Verschiedene klinische Anwendungsgebiete in Abhängigkeit von der Applikationsart sind daher denkbar.

Fundstelle: Am J Dent. 2014 Jun;27(3):134-8. PMID: 25208360

2.2.2. Originalarbeit: Comparison of ozone gas and sodium hypochlorite/chlorhexidine two-visit disinfection protocols in treating apical periodontitis: a randomized controlled clinical trial

Zielsetzung: Diese klinische Studie hatte zum Ziel, die Effektivität des Einsatzes von Ozongas zur Desinfektion des Wurzelkanalsystems bei dem Krankheitsbild der apikalen Parodontitis zu untersuchen.

Material und Methode: In dieser randomisierten kontrollierten klinischen Studie wurden insgesamt 60 Zähne mit radiologisch bestätigter apikaler Parodontitis auf zwei verschiedene Behandlungsprotokolle aufgeteilt: Die Testgruppe wurde im Rahmen der Wurzelkanalbehandlung einer Kanaldesinfektion mit Ozongas (32 g/m³ für 120 s), die Kontrollgruppe erhielt eine Desinfektion mit dem derzeitigen Goldstandard Natriumhypochlorit (NaOCl, 3%, 15 ml über 15 min). Alle anderen Schritte wurden in beiden Gruppen identisch ausgeführt. Es erfolgte jeweils vor Beginn der Kanalaufbereitung, nach Abschluss der mechanischen Präparation und nach Abschluss der Desinfektion eine mikrobiologische Probenentnahme mittels einer Papierspitze. Unter anaeroben Bedingungen erfolgte die Anzucht und Isolierung der enthaltenen Mikroorganismen mit anschließender Identifizierung mittels MALDI/TOF-MS auf Spezieslevel sowie eine Quantifizierung der kompletten Bakterienlast. Nach Abschluss der Wurzelkanalbehandlung erfolgte nach 6 und 12 Monaten eine klinische und radiologische Kontrolle des Behandlungserfolgs. Die Erfolgsrate, der periapikale Index (PAI) sowie die radiologische Größe der apikalen Läsion wurden im Vergleich zur Ausgangssituation als Parameter zur Beurteilung des Behandlungserfolgs herangezogen.

Ergebnisse: Es konnte kein Unterschied zwischen den klinischen Erfolgsraten beider Gruppen nach 6 bzw. 12 Monaten festgestellt werden (Ozon 95,5% vs. NaOCl 95,2% nach 12 Monaten). Ebenso ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei den PAI-Werten sowie den Größen der apikalen Läsionen. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Reduktion

der Bakterienlast durch Ozon oder NaOCl nach Abschluss der Aufbereitung der Wurzelkanäle. Die am häufigsten identifizierten Mikroorganismen waren neben Streptokokken die obligat anaerob wachsenden Gattungen *Parvimonas* spp. und *Prevotella* spp.

Schlussfolgerung: Beide Behandlungsprotokolle führten zu ähnlich hohen klinischen und radiologischen Behandlungserfolgen. Im Rahmen der Limitationen dieser klinischen Studie erscheint daher der Einsatz von Ozongas als Alternative für den derzeitigen Goldstandard NaOCl möglich.

Fundstelle: doi: 10.1007/s00784-016-1849-5.

2.2.3. Originalarbeit: Effect of Polyhexanide as Antiseptic Mouth Rinse against Oral Pathogens in an In Vitro Biofilm Model

Zielsetzung: Diese Untersuchung diente der Überprüfung der Eignung des antimikrobiellen Wirkstoffs Polyhexanid als Mundspüllösung zur Prophylaxe und Therapie oraler Infektionen.

Material und Methode: Es wurden über 5 Tage Biofilme der Spezies *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Staphylococcus aureus* und *Fusobacterium nucleatum* auf Hydroxylapatit-Scheibchen angezüchtet. Die gereiften Biofilme wurden für 30 s mit den Testsubstanzen (ProntOral Mundspüllösung (Polyhexanid 0,15% und verschiedene Zusatzstoffe und Lösungsmittel), reines Polyhexanid 0,15% und Chlorhexidin 0,2% (CHX)) inkubiert. Ein zweiter Versuchsansatz erfolgte nach Eintauchen der Biofilme in defibriniertes Schafsblut, um eine Blutkontamination in der Mundhöhle zu simulieren. Die Biofilmmasse wurde durch eine Kristallviolett-färbung bestimmt. Die Anzahl der überlebenden Mikroorganismen wurde nach Extraktion der Biofilme durch Ausplattieren und Zählen der Kolonie-bildenden Einheiten (CFU/ml) ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U, Kruskal-Wallis- und Dunn's-Test.

Ergebnisse: Es zeigte sich unabhängig von der Blutkontamination eine signifikante Reduktion der Biofilmmasse aller Spezies nach Exposition mit ProntOral. Ebenso konnten Polyhexanid 0,15% und CHX 0,2% bei 5 von 6 Spezies eine Reduktion der Biofilmmasse bewirken. *C. albicans* und *S. aureus* wurden nur durch ProntOral und Polyhexanid 0,15% signifikant reduziert. Keiner der antiseptischen Wirkstoffe konnte die Anzahl von *A. naeslundii* signifikant reduzieren. Nach Blutkontamination zeigte sich bei ProntOral und Polyhexanid 0,15% eine signifikante Reduktion der CFU/ml für alle Spezies, wohingegen bei CHX 0,2% tendenziell eine verringerte Wirksamkeit feststellbar war.

Schlussfolgerung: Polyhexanid (in ProntOral und als Reinsubstanz) zeigten gute Wirksamkeit gegenüber oralpathogenen Mikroorganismen. Zudem scheint die Wirksamkeit nicht durch eine Kontamination mit Blut beeinträchtigt zu sein. Daher ist der Wirkstoff Polyhexanid eine mögliche Alternative zur antiseptischen Spülung der Mundhöhle.

Fundstelle: doi:10.1080/00016357.2021.1899280.

2.2.4. Originalarbeit: Sensitivity of caries pathogens to antimicrobial peptides related to caries risk

Zielsetzung: Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind integraler Bestandteil der Abwehr von Mikroorganismen. Unterschiedliche AMP-Konzentrationen im Speichel von Patienten könnten daher ein Risikofaktor für die Entstehung von bakterienassoziierten Krankheiten wie Karies sein. Diese Studie hat zum Ziel, die Empfindlichkeit von aus Patienten isolierten kariespathogenen Bakterienstämmen gegenüber AMPs mit klinischen Befunden hinsichtlich der Karieserfahrung in Verbindung zu bringen.

Material und Methode: Aus Plaqueproben von Patienten wurden selektiv Bakterienstämme der Spezies *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* und der Gattung *Lactobacillus* angezüchtet und mittels MALDI/TOF-MS identifiziert. Es erfolgte eine Genotyp-Identifizierung für jeden isolierten Bakterienstamm durch eine AP-PCR. Jeder Bakterien-Genotyp wurde als Biofilm angezüchtet und dessen Empfindlichkeit gegenüber den AMPs LL-37, HBD-2, HNP-1 und HNP-3 untersucht. Stämme mit geringer Empfindlichkeit gegenüber AMPs wurden als Hochrisikostämme klassifiziert. Es erfolgte eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Hochrisikostämmen und dem DMFT-Wert, der ein klinisches Maß für die Karieserfahrung eines Patienten darstellt.

Ergebnisse: 47 Patienten mit einem mittleren DMFT-Wert von $11,4 \pm 8,7$ wurden in die Studie aufgenommen. Insgesamt wurden 8 verschiedene Genotypen von *S. mutans*, 30 von *Lactobacillus* spp. und 47 von *A. naeslundii* identifiziert. Die statistische Auswertung der Empfindlichkeitstestung mittels univariater ANOVA ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Konzentration bzw. der Art des jeweiligen AMPs und der Reduktion der vitalen Bakterienzellen. Es konnten so insgesamt 17 Hochrisikostämme von *A. naeslundii*, 2 von *S. mutans* und 6 von *Lactobacillus* spp. identifiziert werden. Die Anzahl der vorkommenden

Hochrisikostämme korrelierte signifikant positiv mit der Höhe des DMFT-Werts ($p < 0,0001$, $r = 0,452$).

Schlussfolgerung: Das Auftreten von gering empfindlichen Stämmen kariespathogener Bakterien kann einen Risikofaktor für die Entstehung von kariösen Läsionen darstellen. Somit ist dieser Ansatzpunkt in der Zukunft ein möglicher Indikator für die Bestimmung des individuellen Kariesrisikos.

Fundstelle: doi: 10.1007/s00784-018-2348-7.

2.2.5. Originalarbeit: Inhibitory effect of LL-37 and human lactoferricin on growth and biofilm formation of anaerobes associated with oral diseases

Zielsetzung: Diese Studie hatte zum Ziel, das Wirkungspotential der antimikrobiellen Peptide (AMP) LL-37 und Lactoferricin H (LfcinH) gegen planktonisch wachsende oralpathogene Bakterien sowie deren Biofilmbildung zu untersuchen.

Material und Methode: Planktonische Multispezies-Kulturen aus fakultativ anaeroben Bakterien („FAB“: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces naeslundii*) und obligat anaeroben Bakterien („OAB“: *Veillonella parvula*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der AMPs für 8 h inkubiert. Das planktonische Wachstum wurde für FAB mit einem stoffwechselbasierten Viabilitätsassay, für OAB durch Ausplattieren und Zählen der Kolonie-bildenden Einheiten (CFU/ml) untersucht. Biofilme wurden auf Zirkonoxid-Plättchen über 4 Tage unter Zugabe der AMPs in unterschiedlichen Konzentrationen gezüchtet. Die Biofilmmasse wurde mittels einer Kristallviolett-Färbung bestimmt.

Ergebnisse: Eine generelle planktonische Wachstumshemmung, als auch Hemmung der Biofilmbildung, konnte sowohl bei FAB als auch OAB beobachtet werden. Zudem konnten Schwellenkonzentrationen zur Hemmung des Wachstums für LL-37 ermittelt werden ($p < 0,0001$), für LfcinH zeigte sich keine solche Schwellenkonzentration. LfcinH zeigte generell eine schwächere Wirksamkeit bei der Hemmung der Biofilmbildung von OAB.

Schlussfolgerung: Insbesondere LL-37 zeigte vielversprechende Eigenschaften hinsichtlich einer Hemmung des planktonischen Wachstums als auch der Biofilmbildung von FAB und OAB. LfcinH alleine scheint auf das Biofilmwachstum eine schwächere Wirkung aufzuweisen.

Fundstelle: doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102301.

2.2.6. Originalarbeit: Targeting antibiotic tolerance in anaerobic biofilms associated with oral diseases: Human antimicrobial peptides LL-37 and lactoferricin enhance the antibiotic efficacy of amoxicillin, clindamycin and metronidazole

Zielsetzung: Das Ziel dieser Studie war es, einen neuen Ansatz zur Therapie biofilm-assoziiierter Infektionen der Mundhöhle aufzuzeigen. Dazu sollte die Wirksamkeit einer kombinierten Applikation von konventionellen Antibiotika mit antimikrobiellen Peptiden auf reife Biofilme evaluiert werden.

Material und Methode: Reife Biofilme aus fakultativ anaeroben Bakterien („FAB“: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces naeslundii*) und obligat anaeroben Bakterien („OAB“: *Veillonella parvula*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*) wurden mit verschiedenen Kombinationen aus Antibiotika (Amoxicillin, Clindamycin, Metronidazol) und antimikrobiellen Peptiden (LL-37, Lactoferricin H (LfcinH)) inkubiert. Die Anzahl der überlebenden Bakterienzellen wurde durch Ausplattieren und Zählen der Kolonie-bildenden Einheiten bestimmt. Zusätzlich wurde die metabolische Aktivität der sesshaften Bakterien im Biofilm als auch der aus dem Biofilm herausgelösten Bakterien mittels eines lumineszenzbasierten Assays zur Messung der intrazellulären ATP-Konzentration untersucht.

Ergebnisse: LL-37 und LfcinH führten zu einer Steigerung der Effektivität der konventionellen Antibiotika Amoxicillin und Clindamycin gegen FAB-Biofilme. OAB-Biofilme zeigten eine herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber Amoxicillin und Clindamycin, was möglicherweise auf reduzierte metabolische Aktivität der Bakterien im Biofilmverbund zurückzuführen ist. Diese Empfindlichkeit konnte durch die Kombination der konventionellen Antibiotika mit LL-37 und LfcinH deutlich gesteigert werden. Hier zeigten auch deutlich geringere Konzentrationen der AMPs eine gute Wirksamkeit.

Schlussfolgerung: Eine Kombination aus antimikrobiellen Peptiden und konventionellen Antibiotika erscheint als vielversprechender Ansatz zur Therapie biofilm-assoziiertes Infektionen. Der Wirkungsmechanismus scheint in einer Aufweichung des Biofilmverbunds durch die Peptide und in der Folge besseren Zugänglichkeit für konventionelle Antibiotika zu liegen.

Fundstelle: doi: 10.1016/j.anaerobe.2021.102439.

3. Diskussion

Neue antimikrobielle Strategien geraten in immer mehr Bereichen der Medizin in den Fokus der Wissenschaft und auch des öffentlichen Interesses. So ist bereits auch vielen medizinischen Laien geläufig, dass der häufige und unkontrollierte Einsatz von Antibiotika zu einer Ausbildung von Resistenzen mit möglichen Komplikationen in der Zukunft auslösen kann. Dabei spielt das Auftreten von Biofilmen eine entscheidende Rolle, da dieser Verbund von Bakterien eine Therapie in vielen Fällen erschwert oder gar unmöglich macht. Daher ist es von größter Wichtigkeit, neue Methoden zur Behandlung solcher Infektionen zu untersuchen. Dies ist vor allem im Hinblick auf in der Mundhöhle eingesetzte Restaurationsmaterialien von Bedeutung, da diese oftmals einen Schwachpunkt mit erleichterter bakterieller Besiedelung darstellen. Ebenso darf keinesfalls die Verträglichkeit und Biokompatibilität neuer Materialien und Verfahren außer Acht gelassen werden.

Im Zuge des vermehrten Einsatzes moderner CAD/CAM-Fertigungsstrategien kommen immer häufiger auch additiv gefertigte zahnärztliche Werkstoffe zum Einsatz (53). Dabei werden lighthärtende Kunststoffmaterialien auf Basis verschiedener Monomere verwendet. Die negativen Auswirkungen von nicht vollständig polymerisierten Monomeren, die im Laufe der Zeit in die Mundhöhle freigesetzt werden können, sind seit langem bekannt (47). Zu den Folgen zählen unter anderem eine erhöhte Rate an Allergien auf solche zahnärztlichen Materialien, aber auch biologisch bedingte Komplikationen, wie eine erhöhte Plaqueakkumulation auf dentalen Restaurationsmaterialien. Diese vermehrte Plaqueanlagerung kann neben einem erhöhten Risiko für die Entstehung sekundärer kariöser Läsionen auch zu einer Veränderung der werkstoffkundlichen Eigenschaften des Restaurationsmaterials haben. Die vermehrte Freisetzung mancher Monomere wie Ethylenglycol-Dimethylacrylat (EGDMA) und Triethylenglycol-Dimethacrylat (TEGDMA) können zu einem vermehrten Wachstum

kariogener Bakterien führen (6, 23). Daher ist es von großer Wichtigkeit, genaue Kenntnis über die von einem neuen Restaurationsmaterial freigesetzten Monomere zu haben.

In der Studie *Elution behavior of a 3D-printed, milled and conventional resin-based occlusal splint material* wurde das Elutionsverhalten von verschiedenen Materialien für die Herstellung von zahnärztlichen Aufbissschienen untersucht. Dabei zeigte sich für das Lösungsmittel Wasser bei konventionell und subtraktiv gefertigten Materialien keine Elution von Monomeren, allerdings konnte bei dem untersuchten 3D-gedruckten Material SHERAprint-ortho plus eine Freisetzung von Tetrahydrofurfuryl-Methacrylat (THFMA) beobachtet werden. Dies ist ein bisher wenig beschriebenes Monomer, daher sind hier nur wenig Daten zur Zytotoxizität und anderen biologischen Wechselwirkungen vorhanden. In der vorliegenden Studie konnte daher erstmals eine EC₅₀-Konzentration für THFMA ermittelt werden (3006 µmol/l). Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass es für sämtliche neuen Materialien in der Zahnmedizin notwendig ist, von den industriellen Herstellern unabhängige Untersuchungen zur Biokompatibilität durchzuführen, da oftmals neue und bisher noch nicht beschriebene Bestandteile enthalten sein können.

Die Untersuchung *Differences in radiopacity, surface properties and plaque accumulation for CAD/CAM fabricated vs. conventionally processed polymer-based temporary materials* befasst sich, neben der Untersuchung einiger werkstoffkundlicher Aspekte, mit der Rate der Plaqueanlagerung auf verschiedenen Werkstoffen für die temporäre Versorgung mit festsitzendem Zahnersatz. Eine solche provisorische Versorgung wird immer dann notwendig, wenn eine indirekte Versorgung durch ein zahntechnisches Labor notwendig ist oder wenn der weitere Verlauf eines Gesamtbehandlungskonzepts noch nicht klar ist. In diesen Fällen wird auch von einer „langzeitprovisorischen Versorgung“ gesprochen. Hier haben sich durch industriell gefertigte Rohlinge für die CAD/CAM-technische Verarbeitung in den letzten Jahren neue Möglichkeiten ergeben, da diese Materialien bessere physikalische Eigenschaften

hinsichtlich ihrer Beständigkeit und Festigkeit aufweisen (52). Die vorliegende Studie beschreibt die unterschiedliche Anlagerungsrate von Bakterien an sowohl CAD/CAM-gefertigte Materialien als auch konventionell (durch Licht- oder Autopolymerisation) hergestellte Materialien. Dabei zeigte sich für die subtraktiv CAD/CAM-gefertigten Materialien eine geringere Biofilm-Bildung für alle untersuchten Bakterienspezies. Gründe für dieses Ergebnis liegen am wahrscheinlichsten in der Homogenität der industriell gefertigten Rohlinge, im Gegensatz zu den direkt am Zahnarztstuhl angemischten konventionellen Materialien. Dies ist vor allem durch die industrielle Herstellung der CAD/CAM-Materialien mit einer Polymerisation unter hoher Temperatur und hohem Druck zu erklären. Der Füllkörpergehalt scheint eine eher untergeordnete Rolle zu spielen, da sowohl bei gefüllten als auch ungefüllten CAD/CAM-Materialien ähnliche Ergebnisse erzielt werden konnten.

Allerdings ist es für viele Werkstoffe nicht möglich, eine industrielle Fertigung zu ermöglichen. So ist es beispielsweise in der Endodontologie, aufgrund der komplexen Anatomie des Wurzelkanalsystems notwendig, eine Wurzelfüllung aus plastisch verformbaren Materialien durchzuführen. Diese umfasst neben dem eigentlichen Wurzelfüllmaterial Guttapercha, vor allem eine pastenartige Substanz, die als endodontischer Sealer Hohlräume im Wurzelkanalsystem verschließt. Hier wäre eine eigene antimikrobielle Wirkung des eingesetzten Materials wünschenswert, da es bei der Behandlung endodontischer Infektionen aufgrund der Unmöglichkeit einer vollständigen Elimination sämtlicher Bakterienzellen aus dem Wurzelkanalsystem, stets zu einer Persistenz von Mikroorganismen kommt (2, 8). In der Studie *A comprehensive in vitro comparison of the biological and physicochemical properties of bioactive root canal sealers* wurde daher neben einigen werkstoffkundlichen Faktoren, die Wirkung von bioaktiven Wurzelkanalsealern auf eine typische Mischung endodontalpathogener Keime untersucht. Dabei konnte bei der Auswahl der Keime auf eine eigene Voruntersuchung zurückgegriffen werden (38). Es zeigte sich bei dem Material AH-

Plus eine sofort nachweisbare antimikrobielle Wirkung, die anderen getesteten Sealer wiesen nach 48 h ebenfalls akzeptable antimikrobielle Eigenschaften auf. Die meisten in der Literatur bekannten Untersuchungen beschäftigen sich im Gegensatz zu unserer Untersuchung lediglich mit der Bakterienspezies *Enterococcus faecalis*, die allerdings in primären endodontischen Infektionen selten bis nie nachgewiesen werden kann (51). Daher bietet die vorliegende Untersuchung ein realistischeres Abbild als solche, die mit lediglich einer einzelnen, selten auftretenden Bakterienspezies durchgeführt wurden.

Neben diesen als Klasse IIa eingestuften Medizinprodukten zur Herstellung von Zahnersatz oder zur Füllung von Wurzelkanälen, werden in der Zahnmedizin nach dem Verlust eines Zahnes auch dentale Implantate in den Kieferknochen eingesetzt, welche nach der Medizinprodukt-Klasse IIb klassifiziert werden, da sie in direkter biologischer Interaktion mit verschiedenen Geweben stehen. Alle bereits beschriebenen Aspekte sind hier ebenso zutreffend und bedürfen für eine bedenkenlose Anwendung einer präzisen und detaillierten wissenschaftlichen Begleitung. Seit einigen Jahren mehren sich die Anzeichen, dass Abrieb von Titanimplantaten zu einer toxischen Reaktion in den kontaminierten Geweben führen kann (24, 25). Der genaue Mechanismus ist hier noch nicht vollständig geklärt. Eine mögliche Alternative stellen hier vollkeramische Implantate dar, da das für die Implantate verwendete Zirkonoxid eine bessere Biokompatibilität zeigt. In der Studie *Intranuclear cell uptake and toxicity of titanium dioxide and zirconia particles as well as bacterial adhesion on dental titanium- and zirconia-implants* wurden daher verschiedene Aspekte der Toxizität und Bioverträglichkeit von Titan- und Zirkonoxidimplantaten im Vergleich untersucht. Dabei wurden orale Zellen mit Mikro- und Nanopartikeln beider Materialien versetzt und die Reaktion hinsichtlich einer DNA-Schädigung beobachtet. Zudem erfolgte eine Untersuchung der Biofilmbildung auf den Implantatoberflächen beider Materialgruppen. Dies spielt insbesondere für die Entwicklung periimplantärer Erkrankungen eine entscheidende Rolle, da trotz vieler Fortschritte eine

Periimplantitis nach wie vor schwer therapierbar ist und daher oft zum Verlust des Implantats führt (48). Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer Aufnahme von Nanopartikeln von Zirkonoxid als auch Titan in den Zellkern kommt, für Zirkonoxid allerdings in einem geringeren Umfang und mit weniger Zellschäden verbunden ist. Zudem wurde eine Überlegenheit der Zirkonoxidimplantate hinsichtlich der Plaqueanlagerung beobachtet, was einen Vorteil für die periimplantären Gewebe darstellt. Somit sind aus Sicht der in dieser Studie untersuchten Aspekte Zirkonoxidimplantate eine gute Alternative zu konventionellen Titanimplantaten. Es gilt hier allerdings weitere Aspekte, wie mechanische Eigenschaften, zu beachten. Hier stehen entsprechende klinische Langzeitergebnisse für Zirkonoxidimplantate noch aus, was eine uneingeschränkte Empfehlung, gerade im kaulastragenden Seitenzahnbereich, noch nicht möglich macht.

Diese Forschungsergebnisse zeigen, dass es unabdingbar ist, vor dem Einsatz von neuen Materialien und Medizinprodukten deren werkstoffkundliche und biologische Eigenschaften zu überprüfen. Die Schwierigkeit in der Zahnmedizin besteht in der Fülle von verwendeten Werkstoffen, was eine große Zahl an Untersuchungsmethoden zur Folge hat. So sollte Versuchen zur Interaktion der oralen mikrobiologischen Flora mit Dentalmaterialien ein großer Stellenwert beigemessen werden, da diese Eigenschaft oftmals den Erfolg einer Therapie in großem Maße beeinflusst. Allerdings wäre eine bessere Standardisierung von Versuchsbedingungen in diesem Bereich wünschenswert, da die vorliegenden Studienergebnisse aufgrund großer Unterschiede im Design oftmals schwer miteinander zu vergleichen sind.

Nach diesen grundlegenden Untersuchungen zur biologischen Interaktion von Dentalmaterialien mit der Mundhöhle, soll nun der Fokus auf Therapiemöglichkeiten einer bereits stattgefundenen bakteriellen Besiedelung von Zahnhartsubstanzen oder Restaurationsmaterialien gelegt werden. An erster Stelle stehen hier chemische oder

physikalische Methoden zur Elimination von Mikroorganismen. Voraussetzung für deren Anwendung ist die Zugänglichkeit der betroffenen Gewebe und eine akzeptable Verträglichkeit des angewendeten Verfahrens. Dies ist in vielen Fällen nicht gegeben, da eine Infektion tiefere, klinisch nicht zerstörungsfrei erreichbare Bereiche umfassen kann. Eine Besonderheit in der Mundhöhle liegt in der koronalen Zahnhartsubstanz, welche meist gut zugänglich ist und gegenüber vielen Verfahren eine große Beständigkeit zeigt. So ist es beispielsweise möglich, ohne wesentliche Beeinträchtigung der Zahnhartsubstanzen Ozon zur Desinfektion von Zahnoberflächen einzusetzen. Ozon ist eine radikalische Verbindung von drei Sauerstoffatomen und besitzt eine breite Wirkung gegenüber Bakterien, Pilzen und speziellen Viren (18). Auch gegen pathogene Erreger der Mundhöhle wurde eine gute Wirksamkeit berichtet. Dies umfasst sowohl Bakterienspezies, die in der Entwicklung kariöser Läsionen beteiligt sind, als auch, zumeist anaerobe, Spezies, die mit der Entwicklung von parodontalen Krankheitsbildern assoziiert sind (20, 34). Hinsichtlich der Biokompatibilität konnte im Vergleich zu anderen in der Zahnmedizin eingesetzten Desinfektionsmitteln eine erfreulich gute Biokompatibilität in-vitro gezeigt werden (33). Zudem ergaben sich Hinweise auf eine mögliche entzündungshemmende Wirkung von durch Ozon veränderten Wassermolekülen in Sinne einer Hemmung des NFκB-Systems, welches eine zentrale Rolle in der Regulation der Entzündungsantwort spielt (32). Die meisten Studien zur antimikrobiellen Wirkung von Ozon beschäftigen sich mit planktonisch gewachsenen Bakterien. Dies ist zur ersten Überprüfung einer Wirksamkeit sinnvoll, allerdings kommen Bakterien bei Infektionen der Mundhöhle und darüber hinaus, in den meisten Fällen als organisierter Biofilm vor. Hier ist es für eine antimikrobielle Substanz ungleich schwieriger, einen entsprechenden Angriffspunkt zur Zerstörung der Mikroorganismen zu erreichen (21). Einen ersten Hinweis zur Wirkung von Ozon auf im Biofilm organisierte Bakterien lieferte die Studie von Huth und Mitarbeitern im Jahr 2009, die ein Biofilm-Modell mit infizierten Wurzelkanälen als Testmodell zur Wirkung

von verschiedenen Desinfektionsprotokollen testete. Dabei zeigte sich, dass hochkonzentriertes Ozongas (32 g/m^3) in der Lage war, sämtliche Mikroorganismen innerhalb des infizierten Wurzelkanals abzutöten (31). Um eine weitere Anwendung von Ozongas präklinisch zu untersuchen, führten wir in der Studie *Antimicrobial effect of gaseous and aqueous ozone on caries pathogen microorganisms grown in biofilms* eine Untersuchung der Wirkung von Ozon auf kariespathogene Bakterien im Biofilm durch. Hierbei zeigten sich ähnliche Ergebnisse, sodass sich Ozongas als brauchbare Alternative zur Desinfektion von mit Bakterien besiedelten Zahnhartsubstanzen erwiesen hat.

Ausgehend davon konnte mit einem Industriepartner ein Applikationsgerät zur Anwendung von Ozongas am Patienten entwickelt werden, bei dem weder der Patient noch der Behandler versehentlich das hoch konzentrierte Ozongas einatmen kann, da dies eine erhebliche Reizung der Atemwege nach sich ziehen würde (41). Dieses Gerät zur Ozonapplikation wurde in der klinischen Studie *Comparison of ozone gas and sodium hypochlorite/chlorhexidine two-visit disinfection protocols in treating apical periodontitis: a randomized controlled clinical trial* hinsichtlich der Eignung im Einsatz bei der Behandlung des Krankheitsbildes apikalen Parodontitis untersucht. Es zeigten sich hier vergleichbare Ergebnisse zwischen der mit Ozon behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe mit dem klinischen Goldstandard Natriumhypochlorit. In der Folge konnten mehrere Studien und Übersichtsarbeiten den klinischen Erfolg der Behandlung von endodontischen Infektionen mit Ozongas bestätigen (49, 50). Kritisch anzumerken ist allerdings der sehr hohe Preis eines solchen Geräts zur Ozonapplikation und eine mögliche technische Einschränkung der Anwendung in Abhängigkeit von der Zahnform.

Da sich die Applikation von Ozon jeweils nur für die gezielte Desinfektion eines begrenzten Hartgewebsareals (z.B. eine Okklusalfäche oder ein Wurzelkanal) als sinnvoll erwiesen hat, spielen auch andere Formen der Desinfektion in der Mundhöhle eine wichtige Rolle. So sind

seit vielen Jahren Mundspüllösungen zur chemischen Plaquekontrolle im Einsatz. Diese kommen vor allem zur Prophylaxe von Karies und Parodontitis bei Patienten mit einer dauerhaften oder temporären Einschränkung der häuslichen Mundhygiene zum Einsatz (5, 7, 35). Zusätzlich werden solche Mundspüllösungen zur perioperativen Prophylaxe einer Infektion bei oralchirurgischen Eingriffen verwendet (9, 45). Der Goldstandard für diese Indikationen ist der kationische Wirkstoff Chlorhexidin (CHX), welcher in einer Vielzahl von Applikationsformen (Spüllösung, Spray, Gel) im Handel erhältlich ist. Dieses Wirkspektrum von CHX umfasst dabei viele Bakterien, Pilze und bestimmte Viren und umfasst auch häufig vorkommende Erreger oraler Infektionskrankheiten (30). Allerdings zeigen sich, vor allem bei längerfristiger Anwendung von CHX Nebenwirkungen in Form von Reizungen der Schleimhäute, Veränderungen der Geschmacksempfindung und Verfärbungen an den Zähnen (26, 39, 54). Eine Alternative hierzu bietet möglicherweise ein aus der Allgemeinchirurgie bekannter Wirkstoff: Das Polykation Polyhexanid wird in der Chirurgie zur Haut- und Schleimhautdesinfektion sowie zur Therapie von chronischen Wunden seit einiger Zeit mit großem Erfolg eingesetzt (4, 19). Dabei zeigten sich außer einer knorpelzellschädigenden Wirkung keine anderen Nebenwirkungen. Es ist sogar davon auszugehen, dass Polyhexanid zu einer Förderung der Proliferation von Fibroblasten und damit zu einer verbesserten Wundheilung beitragen kann (29). Daher wurde in der Laborstudie *Effect of Polyhexanide as antiseptic mouth rinse against oral pathogens in an In Vitro Biofilm Model* eine mögliche Eignung von Polyhexanid in der Bekämpfung oralpathogener Krankheitserreger untersucht. Das verwendete Biofilmmodell wurde als Monospezies-Versuch angewendet, so dass eine selektive Aussage hinsichtlich der Wirksamkeit gegen die getesteten Mikroorganismen getroffen werden konnte. Sowohl die kommerziell erhältliche Mundspüllösung ProntOral mit 0,15% Polyhexanid als auch die Reinsubstanz in derselben Konzentration konnten eine ähnliche Wirkung wie CHX in der Konzentration 0,2% erzielen. Die kommerziell erhältliche Mundspüllösung enthält neben

Polyhexanid noch einen geringen Anteil Eukalyptusöl sowie Menthol. Um die alleinige Wirkung von Polyhexanid aufzuzeigen, wurde dieses als Reinsubstanz ohne weitere Zusätze in einer weiteren Gruppe getestet. Zusätzlich wurde in dieser Studie eine Blutkontamination simuliert, wie sie in der Mundhöhle bei allen chirurgischen Eingriffen naturgemäß vorkommt. CHX wird durch eine Blutkontamination in seiner Wirksamkeit deutlich eingeschränkt, dies konnte auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Erfreulicherweise zeigte der Wirkstoff Polyhexanid keine verminderte Wirksamkeit in den Versuchsgruppen mit Blutkontamination. Es wurde in diesen Gruppen sogar tendenziell eine verbesserte antimikrobielle Wirkung nachgewiesen werden. Dabei konnte kein Unterschied zwischen der kommerziell erhältlichen Mundspüllösung und der Reinsubstanz Polyhexanid nachgewiesen werden, was den Stoff Polyhexanid als primäre Quelle der antimikrobiellen Wirkung identifiziert. Möglicherweise ist die polykationische Struktur von Polyhexanid für diese verringerte Empfindlichkeit gegenüber Kontamination mit organischen Molekülen verantwortlich. Als nächster Schritt sollten klinische, kontrollierte Studien zur Bewertung des klinischen Erfolgs einer Behandlung mit Polyhexanid durchgeführt werden, um eine endgültige Aussage über die Eignung dieses Wirkstoffs zur Schleimhautantiseptik in der Mundhöhle treffen zu können.

Ein neuer Ansatz in der Therapie Biofilm-assoziiierter Erkrankungen der Mundhöhle greift auf einen Bestandteil des unspezifischen Immunsystems zurück: Als Teil einer ersten immunologischen Barriere des Körpers exprimieren verschiedene Gewebe kleine, antimikrobiell wirksame Peptide, sogenannte AMPs (22, 43). Diese Peptide zeigen eine breite Wirksamkeit gegen ein großes Spektrum an Krankheitserregern wie Bakterien, Pilze und Viren. Zudem übernehmen sie wichtige regulatorische Funktionen der weiteren Immunantwort (40). Obwohl diese Peptide bereits seit vielen Millionen Jahren mit Bakterien interagieren, ist es erstaunlicherweise zu keinen nennenswerten Resistenzbildungen gekommen, wie dies von klassischen antibiotischen Wirkstoffen bekannt ist, wo die notwendige Konzentration für eine

ausreichende Hemmung des Bakterienwachstums, die klinisch mögliche Konzentration überschreitet (17). Dies ist von großer Wichtigkeit, insbesondere im Hinblick auf die dramatische Zunahme von Antibiotikaresistenzen in den letzten Jahren, die jedes Jahr tausende Menschenleben kostet (14). Biofilme weisen generell eine erhöhte Toleranz gegenüber Antibiotika auf, was in der speziellen Struktur des Biofilms liegt. Dabei sind vor allem die Einbettung der Mikroorganismen in eine extrazelluläre Matrix sowie veränderte Stoffwechselprozesse zu nennen. Darüber hinaus spielen endogene und erworbene Antibiotikaresistenzen der einzelnen Bakterienspezies eine entscheidende Rolle. Dies erschwert häufig die Therapie der damit assoziierten Erkrankungen (11, 28). Hier stellen AMPs einen interessanten Ansatzpunkt für neue Therapiealternativen dar.

Der Wirkmechanismus dieser Peptide beruht hauptsächlich auf einer Interaktion der zumeist kationischen AMPs mit der bakteriellen Zellmembran, die in der Folge durch eine Bildung von Poren zu einer Destabilisierung und schließlich Lyse der Bakterienzelle führen (59). Es sind verschiedene Gruppen von AMPs beschrieben worden, wobei eine grobe Unterteilung in Cathelicidine, Defensine und Histatine sowie Derivate von Enzymen erfolgen kann (3, 12). Ein Mangel oder auch eine übermäßige Expression von AMPs sind mit verschiedenen, teilweise schwerwiegenden Krankheitsbildern, die oftmals die Haut und Schleimhaut betreffen, assoziiert (46, 57, 58). Neben diesen teilweise bekannten Krankheitsbildern stellt sich in der Zahnmedizin häufig die Frage, wieso ein Teil der Patienten ohne erkennbaren klinischen oder anamnestischen Grund stärker von einer Krankheit wie Karies oder auch Parodontitis betroffen ist. Es liegt auf der Hand, dass es hier noch weitestgehend unbekannte Risikofaktoren für die Entstehung und den Schweregrad des Verlaufs geben muss. Ein Ansatzpunkt ist hier ein möglicherweise unterschiedliches Ansprechen der kariogenen oder parodontalen Bakterienflora auf AMPs. In der Studie *Sensitivity of caries pathogens to antimicrobial peptides related to caries risk* wurde anhand eines Patientenkollektivs dieser Zusammenhang

untersucht. Hierfür wurden aus supragingivalen Plaqueproben der Patienten selektiv Bakterien der Spezies *S. mutans*, *A. naeslundii* und *Lactobacillus* spp. isoliert und mittels MALDI/TOF-MS eindeutig identifiziert. Diese Bakterien sind als Hauptverursacher kariöser Läsionen seit längerer Zeit bekannt (1, 42). Es folgte eine Genotypisierung der gewonnenen Bakterienstämme mittels eines PCR-Verfahrens. Im Anschluss wurde die Wirksamkeit verschiedener AMPs (LL-37, HBD-2, HNP-1 und HNP-3) auf Monospezies-Biofilme der isolierten Bakterienstämme untersucht. Es zeigte sich für alle AMPs eine Wirksamkeit, allerdings nicht für alle Stämme in dem selben Maß. Eine Korrelation des Auftretens von Stämmen mit geringerer Empfindlichkeit gegenüber AMPs mit dem Vorhandensein von klinischen kariösen Läsionen zeigte einen signifikanten Zusammenhang. Daraus lässt sich mit einiger Vorsicht schlussfolgern, dass das Auftreten von solchen geringer empfindlichen Bakterienstämmen einen Einfluss auf das persönliche Kariesrisiko eines Patienten hat.

Aufbauend auf dieser Untersuchung und den daraus gewonnenen Beobachtungen wurden weitere Untersuchungen zum besseren Verständnis der Mechanismen und Wirksamkeit von AMPs auf orale Biofilme und mögliche Ansätze für eine therapeutische Nutzung untersucht. In einer ersten Studie *Inhibitory effect of LL-37 and human lactoferricin on growth and biofilm formation of anaerobes associated with oral diseases* wurden zwei exemplarische AMPs genauer hinsichtlich ihrer Wirkung auf orale Bakterien untersucht. Dabei fiel die Wahl auf das Cathelicidin LL-37, welches bereits in der vorangegangenen Untersuchung gute Ergebnisse lieferte und das Lactoferrin-Derivat Lactoferricin H (LfcinH), das in letzter Zeit in den Fokus vieler Untersuchungen gerückt ist. LfcinH zeigte in einigen Untersuchungen vielversprechende Hemmwirkungen gegen verschiedene Bakterien, allerdings wurden noch keine Daten hinsichtlich einer möglichen Wirksamkeit gegen Biofilme publiziert (55, 56). In der vorliegenden Arbeit wurde ein repräsentatives, zweiteiliges orales Biofilm-Modell entwickelt, welches auch in einer weiteren, darauf aufbauenden Arbeit zum Einsatz kommt. Der erste Teil

des Modells umfasst einen typischen kariogenen Biofilm, bestehend aus fakultativ anaeroben Mikroorganismen („FAB“, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* und *Actinomyces naeslundii*). Ein zweiter Teil des Modells deckt einen typischen subgingivalen, reifen Biofilm ab und besteht aus einer Kombination der obligat anaeroben Spezies („OAB“) *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra* und *Veillonella parvula*. Somit decken diese beiden Biofilmmodelle ein großes Spektrum an damit assoziierten Krankheitsbildern ab und können als Modell zur Untersuchung neuer antimikrobieller Strategien dienen. Als erster Schritt wurde die Wirksamkeit der AMPs LL-37 und LfcinH auf das planktonische Wachstum der FAB und OAB untersucht. Hier zeigten sich konzentrationsabhängige Effekte bei FAB und OAB für LL-37, bei LfcinH konnten keine solchen Schwellenkonzentrationen nachgewiesen werden. Jedoch zeigte LfcinH sowohl gegen FAB und OAB eine antimikrobielle Wirkung. In einem zweiten Set an Versuchen wurde der Einfluss der beiden AMPs auf die Bildung von Biofilmen, also auf eine mögliche Hemmung während der Entstehung, untersucht. Hier zeigte sich ähnlich zu den Versuchen mit planktonischem Wachstum, eine konzentrationsabhängige Wirkung von LL-37 auf FAB und OAB, wobei deutlich höhere Konzentrationen notwendig waren um eine signifikante Reduktion zu erzielen. Im Gegensatz dazu zeigte LfcinH keine Hemmung der Biofilmbildung während dessen Entstehungsphase. Daraus lässt sich schließen, dass LfcinH für die therapeutische Hemmung eines Biofilmwachstums primär nicht geeignet erscheint.

In einer zweiten, darauf aufbauenden Arbeit *Targeting antibiotic tolerance in anaerobic biofilms associated with oral diseases: Human antimicrobial peptides LL-37 and lactoferricin enhance the antibiotic efficacy of amoxicillin, clindamycin and metronidazole* wurde nun der Effekt der AMPs auf ausgereifte Biofilme getestet, was am Ehesten mit einem klinischen Einsatz als therapeutische Substanz verglichen werden kann. Im Hinblick auf die gestiegene Anzahl von Antibiotikaresistenzen wurde zusätzlich ein neuer Ansatz bestehend aus der Kombination von klassischen antibiotischen Substanzen mit AMPs untersucht. Dabei

wurden die AMPs LL-37 und LfcinH mit den in der Zahnmedizin gebräuchlichen Antibiotika Amoxicillin, Clindamycin und Metronidazol kombiniert und die Auswirkungen auf gereifte Biofilme untersucht. Es zeigte sich für die AMPs LL-37 und LfcinH eine gute Wirksamkeit gegenüber gereiften FAB und OAB Biofilmen durch einen deutlichen Rückgang der Bakterienlast. Betrachtet man die Kombinationen aus AMPs und konventionellen Antibiotika konnte für die meisten AMP-Antibiotika-Kombinationen eine Verbesserung der Wirksamkeit beobachtet werden. Insbesondere für anaerobe Biofilme zeigte sich die Kombination aus einem AMP und Amoxicillin oder Clindamycin als besonders wirksam, wobei ein größerer Effekt als eine bloße Addition der Einzeleffekte erzielt werden konnte. Anscheinend kommt es durch AMPs zu einer Auflockerung des Biofilms, was sich durch eine erhöhte Anzahl an aus dem Biofilm herausgelösten Bakterien in den Versuchen zeigte. Dies liefert möglicherweise einen erleichterten Angriffspunkt für klassische Antibiotika, um ihre volle Wirksamkeit gegen Biofilme zu entfalten. Weiterhin konnten in dieser Untersuchung, ausgehend von den Wirkungsmustern der Substanzen, Rückschlüsse auf einige Wirkmechanismen gezogen werden. So zeigte sich, dass die Wirksamkeit von Antibiotika zu einem nicht unerheblichen Teil von der metabolischen Aktivität der zu bekämpfenden Bakterien abhängig ist. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da die meisten antibiotischen Wirkstoffe auf eine Störung des bakteriellen Stoffwechsels abzielen. Insbesondere in anaerob gewachsenen Biofilmen zeigte sich eine deutliche Reduzierung der metabolischen Aktivität, was deren erhöhte Toleranz gegenüber der alleinigen Applikation von Antibiotika erklären kann. Diese Erkenntnisse wurden durch den Vergleich der ATP-Level von planktonischen und im Biofilm sesshaften Bakterien im Hinblick auf die absolute Anzahl an lebenden Zellen (in CFU/ml) gewonnen. Dieses Ergebnis wirft die Frage nach der Interpretation von in der mikrobiologischen Forschung häufig eingesetzten Assays zur Bakterienquantifizierung auf Basis von Stoffwechselforgängen auf. So scheint es eine große Rolle zu spielen, in welchem metabolischen Stadium sich die

Bakterienzelle befindet. Dies kann bei genauer Betrachtung zu Fehlinterpretationen von Assays auf Basis der Stoffwechselaktivität mit einer Überschätzung eines möglichen antimikrobiellen Effekts führen. Dies ist ein Indikator für die Wichtigkeit von Versuchen mit direkter Kultur der untersuchten Mikroorganismen, da nur so eine präzise Aussage über die Anzahl an lebenden Bakterien getroffen werden kann. Abschließend kann der Ansatz der Kombination von AMPs und konventionellen Antibiotika als vielversprechend für die Therapie von Biofilm-assoziierten Erkrankungen gewertet werden. Dies setzt selbstverständlich weitere Untersuchungen zur Verträglichkeit einer solchen Kombinationstherapie sowohl in-vitro als auch in einem späteren Stadium in klinischen Studien voraus.

4. Zusammenfassung

Die Therapie von Biofilm-assoziierten Erkrankungen stellt die moderne Medizin immer wieder vor große Herausforderungen. Gerade im Hinblick auf die steigende Resistenz von Mikroorganismen bedarf es Anstrengungen zur Entwicklung neuer Verfahren und präventiver Konzepte, um für den Patienten das bestmögliche Behandlungsergebnis erzielen zu können. Dies umfasst in der Zahnmedizin unterschiedliche Bereiche, deren enge Verzahnung für den klinischen Erfolg unerlässlich ist. Eine wichtige Rolle spielt die Auswahl geeigneter Materialien für zahnärztliche Restaurationen. Dabei darf neben werkstoffkundlichen Eigenschaften auch die biologische Interaktion der Materialien mit den angrenzenden Hart- und Weichgeweben nicht aus den Augen zu verloren werden. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden verschiedene Materialklassen auf deren biologische Eigenschaften hin untersucht. So konnte nachgewiesen werden, dass vor allem die Fertigungsstrategie unterschiedliche biologische Eigenschaften zur Folge haben kann. Dabei erwies sich die CAD/CAM-Technologie mit teilweise unter idealen industriellen Bedingungen hergestellten Materialrohlingen aus biologischer Sicht als eine gute Möglichkeit zur Erweiterung des Spektrums für die Anfertigung von zahnärztlichen Restaurationen. Auch im Hinblick auf in den Kieferknochen eingebrachte Implantate zum Ersatz fehlender Zähne konnten in dieser Arbeit für Implantate aus Zirkonoxid neue Erkenntnisse gewonnen werden. Dieses neuere Implantatmaterial hat viele positive biologische Eigenschaften, deren Langzeitwirkung bei einem Einsatz in der Mundhöhle durch klinische Studien noch untersucht werden sollten.

All diese grundlegenden Überlegungen bilden die Grundlage für die Auswahl eines Restaurationsmaterials mit dem geringsten Risiko für biologische Komplikationen. Allerdings zeigt sich, gerade im Hinblick auf die bereits bestehende Literatur, eine große Heterogenität der berichteten Studienergebnisse. Eine Vereinheitlichung von Methoden zur Prüfung von

bakterieller Adhäsion und antimikrobieller Wirksamkeit wäre ein wichtiger Schritt, um generell gültige Empfehlungen auf diesem Gebiet aussprechen zu können.

In vielen Fällen ist es allerdings bereits zu einer Besiedelung von Hart- und Weichgeweben oder Restaurationsmaterialien mit pathogenen Mikroorganismen gekommen. Die daraus resultierenden Krankheitsbilder sind vielfältig und umfassen in der Zahnmedizin die beiden von Seiten der Prävalenz her dominierenden Erkrankungen Karies und Parodontitis. Deren Therapie umfasst stets eine möglichst vollständige Elimination der bakteriellen Besiedelung auf erkrankten Oberflächen. Gerade bei Patienten mit Parodontitis ist dies in den betroffenen Hart- und Weichgeweben oft nicht mit den konventionellen chemisch-physikalischen oder mechanischen Maßnahmen möglich, hier müssen andere Konzepte, beispielsweise auf pharmakologischer Basis zum Einsatz kommen. Verschiedene antimikrobielle Strategien wurden im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht. So konnten für den Einsatz von Ozon positive Ergebnisse auf pathogene Mikroorganismen in der Mundhöhle gewonnen werden, was durch eine klinische Studie zur Therapie endodontischer Infektionen bestätigt wurde. Somit könnte dieser Ansatz eine Alternative zu klassischen Desinfektionsprotokollen zu sein. Aus technischen Gründen und der Notwendigkeit einer teuren Apparatur ist es nicht möglich, Ozon im Bereich des Parodontiums oder in der häuslichen Plaquekontrolle einzusetzen.

Hier bieten sich eher Spüllösungen auf Basis antimikrobiell wirksamer Substanzen an. Ein neuer Ansatz ist der Einsatz des aus der Allgemein Chirurgie bereits gut bekannten Wirkstoffs Polyhexanid. Dieser hat einige vielversprechende Eigenschaften was die Gewebeverträglichkeit und Wundheilungsförderung angeht, die gerade auch in der Zahnmedizin und oralen Chirurgie von großem Interesse sind. Die in dieser Arbeit nachgewiesene gute Wirksamkeit von Polyhexanid, auch in einer blutkontaminierten Umgebung, machen Polyhexanid zu einer gute Alternative zur Desinfektion und Plaquekontrolle in der Mundhöhle. Oftmals ist es aber nicht möglich, infizierte und entzündete

Gewebsareale mit einer Spüllösung zu erreichen, zum Beispiel in tiefen Zahnfleischtaschen. Auch eine mechanisch-physikalische Elimination der Mikroorganismen ist hier nicht unproblematisch möglich. Der klassische Ansatz in der Medizin ist dann der Einsatz von systemisch applizierten antimikrobiellen Substanzen, die als Antibiotika bekannt sind. Diese zeigen, abhängig von der Wirkstoffklasse, unterschiedliche Angriffspunkte zur Inhibition der Mikroorganismen. Viele dieser Wirkungsmechanismen werden durch Anpassung der Krankheitserreger im Laufe der Zeit abgeschwächt. Diese Resistenzbildung stellt die Medizin vor immer größer werdende Herausforderungen. Eine interessante Alternative stellen hier antimikrobiell wirksame Peptide (AMPs) dar. Diese körpereigenen Peptide zeigen trotz einer evolutionär langen Koexistenz mit Krankheitserregern keine solchen Wirkungseinbußen. Daher sind sie möglicherweise in der Lage, auch gegen resistente Mikroorganismen eine Therapieoption darzustellen. In zwei Arbeiten wurde daher in einem neu entwickelten in-vitro Biofilm-Modell die Wirksamkeit von AMPs gegen oralpathogene Bakterien untersucht. Die hier gewonnenen positiven Erkenntnisse machen AMPs besonders interessant, um bakterielle Biofilme zu bekämpfen, da diese in der Lage sind, den Biofilm aufzulockern und damit einen Angriffspunkt für konventionelle Antibiotika zu schaffen. Dieses vielversprechende Konzept bedarf noch weiterer Überprüfung in-vitro und in klinischen Studien. Es stellt aber einen neuen Ansatz bei der Bekämpfung Biofilm-assoziiierter Infektionen dar, da er einen alternativen Wirkmechanismus besitzt und möglicherweise weniger anfällig hinsichtlich der Entwicklung von Resistenzen ist.

Zusammenfassend kann ausgehend von dieser Arbeit festgestellt werden, dass es im Hinblick auf die Vermeidung und Therapie Biofilm-assoziiierter Infektionen im Bereich der Mundhöhle verschiedene neue Ansatzpunkte gibt. Neben der werkstoffkundlichen Entwicklung neuer Materialien spielen dabei innovative antimikrobielle Konzepte eine große Rolle. Diese Ansätze

gilt es in den kommenden Jahren mit dem Ziel einer weiter verbesserten Prophylaxe und Therapie oraler Infektionen weiter auszubauen und zu verfeinern.

5. Literaturverzeichnis

1. Al Shukairy H, Alamoudi N, Farsi N, Al Mushayt A, Masoud I. 2006. A comparative study of *Streptococcus mutans* and lactobacilli in mothers and children with severe early childhood caries (SECC) versus a caries free group of children and their corresponding mothers. *J Clin Pediatr Dent* 31:80–85.
2. Alsubait S, Albader S, Alajlan N, Alkhunaini N, Niazy A, Almahdy A. 2019. Comparison of the antibacterial activity of calcium silicate- and epoxy resin-based endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms: a confocal laser-scanning microscopy analysis. *Odontology* 107:513–520.
3. Bals R. 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* 1:141–150.
4. Bellingeri A, Falciani F, Trapedini P, Moscatelli A, Russo A, Tino G, Chiari P, Peghetti A. 2016. Effect of a wound cleansing solution on wound bed preparation and inflammation in chronic wounds: a single-blind RCT. *J Wound Care* 2016/03/08. 25:160,162-166,168.
5. Burtner AP, Low DW, McNeal DR, Hassell TM, Smith RG. 1991. Effects of chlorhexidine spray on plaque and gingival health in institutionalized persons with mental retardation. *Spec Care Dent* 1991/05/01. 11:97–100.
6. Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, Van Der Mei HC. 2010. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dent Res* 89:657–665.
7. Clavero J, Baca P, Junco P, Gonzalez MP. 2003. Effects of 0.2% chlorhexidine spray applied once or twice daily on plaque accumulation and gingival inflammation in a geriatric population. *J Clin Periodontol* 2003/09/06. 30:773–777.
8. Colombo M, Poggio C, Dagna A, Meravini MV, Riva P, Trovati F, Pietrocola G. 2018. Biological and physico-chemical properties of new root canal sealers. *J Clin Exp Dent* 10:e120–e126.
9. Cortellini P, Labriola A, Zambelli R, Prato GP, Nieri M, Tonetti MS. 2008. Chlorhexidine with an anti discoloration system after periodontal flap surgery: a cross-over, randomized, triple-blind clinical trial. *J Clin Periodontol* 2008/04/22. 35:614–620.
10. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318–1322.
11. Crabbé A, Jensen PØ, Bjarnsholt T, Coenye T. 2019. Antimicrobial Tolerance and Metabolic Adaptations in Microbial Biofilms. *Trends Microbiol* 27:850–863.
12. Dale BA, Fredericks LP. 2005. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol* 7:119–133.
13. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280:295–298.
14. Davies J, Davies D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:417–433.

15. di Luca M, Maccari G, Nifosí R. 2014. Treatment of microbial biofilms in the post-antibiotic era: Prophylactic and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools. *Pathog Dis* 70:257–270.
16. Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167–193.
17. Duplantier AJ, van Hoek ML. 2013. The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 as a potential treatment for polymicrobial infected wounds. *Front Immunol* 4:1–14.
18. Dyas A, Boughton BJ, Das BC. 1983. Ozone killing action against bacterial and fungal species; microbiological testing of a domestic ozone generator. *J Clin Pathol* 36:1102–1104.
19. Eberlein T, Assadian O. 2010. Clinical use of polihexanide on acute and chronic wounds for antiseptis and decontamination. *Ski Pharmacol Physiol*2010/09/21. 23 Suppl:45–51.
20. Eick S, Tigan M, Sculean A. 2012. Effect of ozone on periodontopathogenic species--an in vitro study. *Clin Oral Investig* 16:537–544.
21. Grassi L, Maisetta G, Esin S, Batoni G. 2017. Combination Strategies to Enhance the Efficacy of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. *Front Microbiol* 8:2409.
22. Hancock REW, Sahl HG. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* 24:1551–1557.
23. Hansel C, Leyhausen G, Mai UE, Geurtsen W. 1998. Effects of various resin composite (co)monomers and extracts on two caries-associated micro-organisms in vitro. *J Dent Res* 77:60–67.
24. He X, Hartlieb E, Rothmund L, Waschke J, Wu X, Van Landuyt KL, Milz S, Michalke B, Hickel R, Reichl F-X, Högg C. 2015. Intracellular uptake and toxicity of three different Titanium particles. *Dent Mater* 31:734–744.
25. He X, Reichl F-X, Milz S, Michalke B, Wu X, Sprecher CM, Yang Y, Gahlert M, Röhling S, Kniha H, Hickel R, Högg C. 2020. Titanium and zirconium release from titanium- and zirconia implants in mini pig maxillae and their toxicity in vitro. *Dent Mater* 36:402–412.
26. Hepso HU, Bjornland T, Skoglund LA. 1988. Side-effects and patient acceptance of 0.2% versus 0.1% chlorhexidine used as post-operative prophylactic mouthwash. *Int J Oral Maxillofac Surg*1988/02/01. 17:17–20.
27. Høiby N. 2017. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS* 125:272–275.
28. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35:322–332.
29. Hubner NO, Kramer A. 2010. Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide, a modern wound antiseptic. *Ski Pharmacol Physiol*2010/09/21. 23 Suppl:17–27.
30. Huth KC, Quirling M, Lenzke S, Paschos E, Kamereck K, Brand K, Hickel R, Ilie N. 2011. Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. *Eur J Oral Sci*2011/05/14. 119:204–210.

31. Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, Paschos E, Welsch U, Miethke T, Brand K, Hickel R. 2009. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int Endod J* 42:3–13.
32. Huth KC, Saugel B, Jakob FM, Cappello C, Quirling M, Paschos E, Ern K, Hickel R, Brand K. 2007. Effect of aqueous ozone on the NF-kappaB system. *J Dent Res* 86:451–456.
33. Huth KC, Jakob FM, Saugel B, Cappello C, Paschos E, Hollweck R, Hickel R, Brand K. 2006. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci* 114:435–440.
34. Johansson E, Claesson R, van Dijken JW V. 2009. Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. *J Dent* 37:449–453.
35. Kalaga A, Addy M, Hunter B. 1989. The use of 0.2% chlorhexidine spray as an adjunct to oral hygiene and gingival health in physically and mentally handicapped adults. *J Periodontol* 1989/07/01. 60:381–385.
36. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. 2014. Global burden of severe periodontitis in 1990–2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res* 93:1045–1053.
37. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. 2015. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res* 94:650–658.
38. Kist S, Kollmuss M, Jung J, Schubert S, Hickel R, Huth KC. 2017. Comparison of ozone gas and sodium hypochlorite/chlorhexidine two-visit disinfection protocols in treating apical periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Investig* 21:995–1005.
39. Lachapelle JM. 2014. A comparison of the irritant and allergenic properties of antiseptics. *Eur J Dermatol* 2014/02/05. 24:3–9.
40. Mansour SC, Pena OM, Hancock REW. 2014. Host defense peptides: Front-line immunomodulators. *Trends Immunol* 35:443–450.
41. Millar BJ, Hodson N. 2007. Assessment of the safety of two ozone delivery devices. *J Dent* 35:195–200.
42. Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. 2004. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol* 42:3023–3029.
43. Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Gallo RL. 2002. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J Dent Res* 81:845–850.
44. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemmig TF, Garcia R, Giannobile W V., Graziani F, Greenwell H, Herrera D, Kao RT, Kebschull M, Kinane DF, Kirkwood KL, Kocher T, Kornman KS, Kumar PS, Loos BG, Machtei E, Meng H, Mombelli A, Needleman I, Offenbacher S, Seymour GJ, Teles R, Tonetti MS. 2018. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol* 45:S162–S170.

45. Polat HB, Ozdemir H, Ay S. 2008. Effect of different mouth rinses on third molar surgery-related oral malodor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008/02/19. 105:e1--8.
46. Pütsep K, Carlsson G, Boman HG, Andersson M. 2002. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: An observation study. *Lancet* 360:1144–1149.
47. Schmalz G, Galler KM. 2017. Biocompatibility of biomaterials - Lessons learned and considerations for the design of novel materials. *Dent Mater* 2017/02/27. 33:382–393.
48. Schwarz F, Ramanauskaite A. 2022. It is all about peri-implant tissue health. *Periodontol* 2000 88:9–12.
49. Silva EJNL, Prado MC, Soares DN, Hecksher F, Martins JNR, Fidalgo TKS. 2020. The effect of ozone therapy in root canal disinfection: a systematic review. *Int Endod J* 53:317–332.
50. Sinha N, Asthana G, Parmar G, Langaliya A, Shah J, Kumbhar A, Singh B. 2021. Evaluation of Ozone Therapy in Endodontic Treatment of Teeth with Necrotic Pulp and Apical Periodontitis: A Randomized Clinical Trial. *J Endod* 47:1820–1828.
51. Siqueira JFJ, Rôças IN. 2008. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 34:1291-1301.e3.
52. Stawarczyk B, Ender A, Trottmann A, Özcan M, Fischer J, Hämmerle CHF. 2012. Load-bearing capacity of CAD/CAM milled polymeric three-unit fixed dental prostheses: effect of aging regimens. *Clin Oral Investig* 16:1669–1677.
53. Tian Y, Chen C, Xu X, Wang J, Hou X, Li K, Lu X, Shi H, Lee E-S, Jiang HB. 2021. A Review of 3D Printing in Dentistry: Technologies, Affecting Factors, and Applications. *Scanning* 2021:9950131.
54. Van Strydonck DA, Slot DE, Van der Velden U, Van der Weijden F. 2012. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2012/09/11. 39:1042–1055.
55. Wakabayashi H, Takase M, Tomita M. 2003. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Curr Pharm Des* 9:1277–1287.
56. Wakabayashi H, Yamauchi K, Kobayashi T, Yaeshima T, Iwatsuki K, Yoshie H. 2009. Inhibitory effects of lactoferrin on growth and biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3308–3316.
57. Yamanaka K, Yamamoto O, Honda T. 2021. Pathophysiology of psoriasis: A review. *J Dermatol* 48:722–731.
58. Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A, Murakami M, Ohtake T, Coda A, Dorschner RA, Bonnart C, Descargues P, Hovnanian A, Morhenn VB, Gallo RL. 2007. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat Med* 13:975–980.
59. Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389–395.

6. Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich über die vergangenen Jahre bei meiner wissenschaftlichen Arbeit unterstützt und begleitet haben. An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Professor Reinhard Hickel bedanken: Als Vorsitzender meines Fachmentorats und langjährigen Chef, für die Möglichkeit an der Poliklinik für Zahnerhaltung wissenschaftlich tätig sein zu dürfen. Vielen Dank für die immerwährende Unterstützung in allen wissenschaftlichen und fachlichen Belangen. Den weiteren Mitgliedern meines Fachmentorats Herrn Professor Daniel Edelhoff und Herrn Professor Sören Schubert danke ich für ihre Begleitung in der Zeit der Anfertigung dieser Arbeit und ihre immer wohlwollende Unterstützung und Hilfe bei allen Fragen.

Besonderer Dank gilt der Betreuerin meiner Doktorarbeit, Frau Professor Karin Huth. Seit dieser Zeit ist Sie mir als Kollegin und Kooperationspartnerin über viele Jahre besonders verbunden. Die vielen gemeinsamen Projekte und der rege fachliche und wissenschaftliche Austausch haben mein Interesse an der wissenschaftlichen Arbeit geweckt und mich ermutigt diesen Weg immer weiter zu verfolgen.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei den beiden Menschen bedanken, die mir beginnend mit meinem Studium und darüber hinaus alles erst ermöglicht haben: Meine Eltern Sabine und Robert Kollmuß. Ich danke ihnen für ihre immerwährende Liebe und vorbehaltlose Unterstützung in allen Lebenslagen. Sie tragen einen entscheidenden Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit, da sie und meine ganze Familie mich über die Jahre immer wieder ermutigt haben, dieses Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Lebensgefährtin Frau Dr. Sabina Würsching für ihre liebevolle und zielstrebige Unterstützung und Motivation auf allen denkbaren Ebenen bedanken. Sie hat mich auf emotionaler und fachlicher Ebene stets motiviert den Weg weiter zu beschreiten und hat daher einen großen Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit. Sabinas Familie, allen voran Frau Dr. Adila Dodhy-Würsching, gilt mein besonderer Dank für die vielen

anregenden Gespräche und die immerwährenden Ermutigungen, auch bei Rückschlägen nicht aufzugeben.