

4. Diskussion

4.1 Modell und Vorversuche

Eine Besonderheit der dentalen Plaque liegt in ihrer schlechten Entfernbarekeit (Liljemark *et al.* 1997). Als probatestes Mittel zur Entfernung von *supragingivaler* Plaque gilt die mechanische Reinigung der Zähne (Gottenbos *et al.* 1999) mit den bekannten Mitteln: Zahnbürste, Zahnpaste, Zahnseide und bei Indikation mit Hölzchen oder Zwischenraumbürsten. Die zahnärztliche Untersuchung zeigt jedoch immer wieder, dass die meisten Menschen nicht in der Lage sind, eine effiziente mechanische Reinigung der Mundhöhle durchzuführen (Millward und Wilson 1989; Marsh und Bradshaw 1993; Thrower *et al.* 1997; Pratten *et al.* 1998b). Die vorhandene Situation (kariöse Läsionen oder parodontale Defekte) und Anfärbeversuche der Zähne beweisen dies nachdrücklich. Besonders die Pflege der interdentalen Zwischenräume stellt sich dabei als schwierig dar. Stellungsanomalien der Zähne verkomplizieren die Situation noch weiter. Die Hygiene der Approximalräume ist somit ein Hauptproblem, da an diesen schlecht zugänglichen Stellen die meiste Plaque entsteht (Marsh 1993, 1999). Als noch schwieriger gestaltet sich die Entfernung *subgingivaler* Plaque. Hier kann nur ein Zahnarzt im Rahmen einer professionellen Zahnreinigung Abhilfe schaffen. *Subgingivale* Plaque ist der hauptsächlichste Initiator für die Entstehung einer parodontalen Läsion (Fine 1995). Die Entstehung *subgingivaler* Plaque steht in Beziehung zum Vorhandensein von *supragingivaler* Plaque. Daher führt die alleinige Entfernung *subgingivaler* Plaque schnell zu einer

Rekolonisation des subgingivalen Bereiches, ausgehend von der *supragingivalen* Plaque (Fine 1995). Einen kleinen Beitrag, die bakterielle Säureproduktion zu senken, soll die Umstellung der Ernährung leisten. Eine Rolle spielen dabei nicht-fermentierbare Süßstoffe bzw. das Essverhalten per se (Marsh und Bradshaw 1995). Das Hauptaugenmerk liegt jedoch darauf, die mechanische Mundhygiene durch antimikrobielle Substanzen zu unterstützen (Herles *et al.* 1994; Fine 1995; Wilson 1996; Wilson *et al.* 1996a und b; Thrower *et al.* 1997; Pratten *et al.* 1998b; Wilson *et al.* 1998; Wilson 1999).

Die Weiterentwicklung derartiger Substanzen erfordert *in vitro* Modelle, die die Wirksamkeitsprüfung an Biofilmen einfach und reproduzierbar ermöglichen (Zelver *et al.* 1999). Grundvoraussetzung war zunächst die Herstellung von Biofilmen. Dabei ist man sich durch die gesamte Literatur hindurch einig, dass sich planktonische Zellen stark von Zellen unterscheiden, die in Biofilmen organisiert sind (Brown *et al.* 1988; Marsh und Bradshaw 1995). Speziell die den Biofilmen eigene hohe Resistenz im Vergleich zu planktonischen Zellen wird dabei besonders hervorgehoben (s.u. **4.2**).

In Bezug auf die Praktikabilität war die Wachstumskammer so konstruiert, dass 16 Biofilme gleichzeitig gezüchtet und diese auch separat entnommen werden konnten (Ten Cate und Marsh 1994). Eine größere Anzahl an Testkörpern wäre statistisch aussagekräftiger. Der Constant Depth Film Fermenter (im folgenden CDFF) enthält je nach Ausführung 75 bzw. 90 Probekörper (Wimpenny 1999). Diese große Anzahl macht die Versuche jedoch auch unübersichtlicher und sprengt den zeitlichen Rahmen, da die Antiseptika und Neutralisationsmittel für eine bestimmte Zeit einwirken müssen.

Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit war eine wesentliche Forderung erfüllt: die Verwendung der kontinuierlichen Fliesstechnik (cfc = continuous flow culture technique) (Peyton und Characklis 1995; Bradshaw und Marsh 1999). Diese Technik stellt nach Wimpenny (1985) heute einen Standard dar und gilt als ideal (Bowden 1999). Sie erzeugt ein steady state (Allison *et al.* 1999; Zinn 1999), und über den gleichmäßigen Nährstoff- und Gasgradienten im System (Allison *et al.* 1999) kann die natürliche Situation (Bryers 1993), d.h. die Mundhöhle (Rogers 1988) bzw. der Speichelfluss (Herles *et al.* 1994; Larsen und Fiehn 1996) am besten simuliert werden. Uneinigkeit herrscht über die Verdünnungsrate. Die vorgestellten Systeme verwenden Verdünnungsraten von 0,05/h (McKee *et al.* 1985; McDermid *et al.* 1987) über 0,06/h (Embleton *et al.* 1998) bis 0,1/h (Bradshaw *et al.* 1990, 1996; Dibdin und Wimpenny 1999). Die Flussrate steht nach Anwar und Costerton (1990) in keiner Beziehung zur Wachstumsrate der Biofilmbakterien, da sie in der Glykokalyx eingebettet sind und mit dem Nährmedium in keinem direkten Kontakt stehen. Deshalb wurde der Fliessrate im hier vorgestellten System keine besondere Bedeutung zugemessen. Das Kulturvolumen beträgt 350 ml mit einer Fliessrate von 10 ml/h. Daraus ergibt sich eine Verdünnungsrate von 0,029/h.

Die in der Literatur vorgestellten Modelle sind sehr vielgestaltig. Als einfachste Varianten werden Agar-Platten, Membran-Filter und Chemostate genannt (Wilson 1996). Komplexere Modelle wie das Robbins Device, der Roto Torque, CAMM, Fluidized Bed Reactors oder Rotating Disk Aerators sind nach Wimpenny (1997) für die Untersuchung oraler Biofilme ungeeignet. Lediglich der schon erwähnte CDFD wird allgemein als das beste Modell anerkannt, da er alle Vorteile in sich vereint – besonders die des steady state und der

Reproduzierbarkeit – und somit die *in vivo* Situation am besten widerspiegelt (Brown und Gilbert 1993; Kinniment *et al.* 1996; Wilson 1996; Wilson *et al.* 1996a; Pratten *et al.* 1998a und b; Wilson *et al.* 1998; Dibdin und Wimpenny 1999; Pratten und Wilson 1999; Wilson 1999). Sicherlich wurde bei seiner Konstruktion an viele Parameter gedacht, die für eine möglichst genaue Simulierung der Mundhöhlenverhältnisse möglicherweise von entscheidender Bedeutung sind. Auch die Reproduzierbarkeit ist sehr gut. Jeder Biofilm lässt sich mittels eines einstellbaren Schabers auf eine bestimmte Dicke herstellen. Alle diese Parameter verkomplizieren jedoch das zudem kostenintensive Modell.

Das eigene Modell ist dagegen unkompliziert, ausgesprochen kostengünstig und liefert reproduzierbare Ergebnisse.

Als Probekörper wurden Hydroxylapatit-Plättchen eingesetzt. Diese stimmen mit der chemischen Zusammensetzung des Zahnschmelzes, in dem Hydroxylapatit als Hauptbestandteil enthalten ist, überein (Bradshaw *et al.* 1996; Bradshaw und Marsh 1999). Deshalb sind sie als Imitation der Zahnoberfläche geeignet (Appelbaum *et al.* 1979; Herles *et al.* 1994; Gong *et al.* 1998; Amano *et al.* 1999). Das scheint in jedem Fall sinnvoller zu sein, als irgendwelche anderen Materialien einzusetzen. In der Literatur finden sich eine Reihe ähnlicher Testmodelle wie das hier vorgestellte, jedoch werden fast immer Probekörpermaterialien wie Acrylate (Keevil *et al.* 1987; Anwar *et al.* 1989; Anwar und Costerton 1990), Silikon (Prosser *et al.* 1987; Larsen und Fiehn 1996), Membranfilter (Millward und Wilson 1989; Thrower *et al.* 1997) oder dentale Füllungsmaterialien wie Amalgam (Wilson *et al.* 1998; Wilson 1999) verwendet.

In Bezug auf die Oberflächenbeschaffenheit der Plättchen gehen die Meinungen sehr stark auseinander. Die einen fordern eine möglichst

rauhe Oberfläche, weil sich ein Biofilm darauf am besten bilden kann (Scheie 1994; Apilanez *et al.* 1998; Bradshaw und Marsh 1999). Die anderen sehen nicht die Rauigkeit, sondern die Hydrophobie der Oberfläche als den entscheidenden Faktor an (Eginton *et al.* 1995). Einigkeit herrscht dagegen hinsichtlich der Oberflächenladung. Eine hohe freie Energie (Scheie 1994) bzw. eine positiv geladene Oberfläche (Apilanez *et al.* 1998) ist für die bakterielle Anhaftung förderlich. Hydroxylapatit selbst ist negativ geladen. Das umgebende Medium kann jedoch als Brücke zwischen Hydroxylapatit und der ebenfalls negativ geladenen mikrobiellen Oberfläche wirken. In der Mundhöhle nimmt der Speichel mit seinen positiv geladenen Ca^{2+} -Ionen diese Brückenstellung ein (Scheie 1994).

Wie gerade angedeutet, kommt neben der Oberflächenstruktur dem Wachstumsmedium eine entscheidende Bedeutung zu. Erste Versuche, einen Biofilm mit dem vorgestellten System auszulösen, misslangen. Es stellte sich deshalb die Frage, ob eine Veränderung am Nährmedium Erfolg zeigen würde. Die Literatur beschreibt fast ausschließlich Testsysteme, in denen künstlicher Speichel oder wenigstens ein Mucinzusatz im Medium verwendet wurden. Auffällig war, dass bei einem Mucinzusatz immer 2,5 g/l im Medium gelöst wurden. Für den Einsatz von künstlichem Speichel gibt es im wesentlichen zwei Gründe. Einerseits soll er durch den Überzug der Probekörper einen Film auf diesen erzeugen, der der Pellicle auf den Zähnen ähnlich ist. Dieser Film stellt die für die bakterielle Anhaftung wichtigen Adhäsine zur Verfügung und dient somit einer besseren Anhaftung (Hardie und Bowden 1975; Appelbaum *et al.* 1979; Herles *et al.* 1994; Scheie 1994; Bradshaw *et al.* 1995; Fine 1995; Larsen und Fiehn 1996; Liljemark *et al.* 1997; Hamilton 1998; Amano *et al.* 1999; Bowden und Kolenbrander *et al.* 1999; Wilson 1999). Pratten *et al.*

(1998b) konnten sogar eine Verdoppelung der Wachstumsrate feststellen, wenn die Oberflächen mit Speichel vorbehandelt worden waren. Die enthaltenen Adhäsine haben eine so hohe Aktivität, dass erst eine Verdünnung von 1:1000 eine Abnahme der Adhäsionsrate erkennen lässt (Rosan *et al.* 1982b). Andererseits soll der Speichel als Nahrungs- bzw. Kohlenstoffquelle für die Bakterien dienen. Verantwortlich hierfür sind im Speichel enthaltene Proteine und Glykoproteine (Marsh und Bradshaw 1995; Bowden 1997; Bowden und Hamilton 1998; Wilson 1999). Die Funktion als Nährmedium wird aber auch infrage gestellt (Liljemark *et al.* 1997). Das zugefügte Schweinemagenmucin soll eine Vereinfachung des Nährmediums darstellen. Das Mucin fungiert in Anlehnung an das Speichelmucin als Nahrungsquelle (Bradshaw *et al.* 1996; Bowden 1999). Bradshaw *et al.* (1990) gehen davon aus, dass Oligosaccharid-Seitenketten des Mucins Kohlehydrate für das bakterielle Wachstum bereitstellen bzw. dass das Mucin als Zuckerersatz dient (Bradshaw und Marsh 1999). Verallgemeinernd ausgedrückt stellt das Mucin eine Kohlenstoffquelle dar (Ten Cate und Marsh 1994; Kinniment *et al.* 1996; Dibdin und Wimpenny 1999).

Eigene Versuche einer mit 2,5 g/l Schweinemagenmucin supplementierten Nährlösung (s. Abschnitt **3.4 Ergebnisse**) ließen keine Unterschiede im Bakterienwachstum erkennen. Die Keimzahlen jedoch waren grundsätzlich um 1 log-Stufe niedriger angesiedelt als im Versuchsansatz ohne Mucin. Dieser gegenüber den Erwartungen konträre Effekt stellt die Funktion von Speichel oder dessen Inhaltsstoffen im verwendeten Modell infrage. Die anfänglichen Fehlversuche, einen Biofilm herzustellen, konnten schließlich durch die Verwendung eines zu häufig überimpften Keimes erklärt werden. Es gibt einige Hinweise in der Literatur, dass eine häufige Überimpfung von Keimen im Labor zu einem Verlust der

Adhäsionsfähigkeit führen kann (Khoury *et al.* 1992; Scheie 1994; Costerton 1995, 1997). Während der Überimpfungsvorgänge werden keine adhärenen Zellen mit überimpft, so dass die übertragenen Zellen im Anschluss nur ein schnelles Wachstum zeigen (Costerton 1999). Als Nährmedium wurde eine Bouillon (BHI = Brain Heart Infusion) eingesetzt. Damit konnte die Schwierigkeit der Standardisierung eines Mediums umgangen werden, das künstlichen Speichel enthält. Die Speichelzusammensetzung ist nämlich extrem komplex (Wilson 1999). Außerdem gibt es viele verschiedene Rezepturen und es besteht die Schwierigkeit, den Speichel zu autoklavieren.

In Anlehnung an Larsen und Fiehn (1996) wurde das BHI-Nährmedium mit 1% Saccharose supplementiert. So konnten durchschnittlich höhere Zellwerte auf den Plättchen erzielt werden ($4,6 \times 10^6$ pro mm^2) als bei Verwendung künstlichen Speichels, mit dem Werte von 5×10^4 pro mm^2 erreicht wurden (Pratten *et al.* 1998b) (s.o.). Die Saccharose soll dabei dem Bakterienwachstum förderlich sein (Wimpenny 1997; Wilson *et al.* 1998). Einerseits wird die Anhaftung an die Oberflächen erleichtert (Scheie 1994; Bowden 1997), andererseits wird die Synthese von Exopolysacchariden gefördert, was sich in einer vermehrten Matrixbildung zeigt (Rolla *et al.* 1987; Bowden 1997; Sissons 1997; Embleton *et al.* 1998; Wilson *et al.* 1998; Pratten und Wilson 1999). Streptokokkale Fructosyl- und Glucosyltransferasen sollen dabei aus der Saccharose das für den Matrixaufbau wichtige Glucan produzieren (Scheie 1994; Bowden und Hamilton 1998).

Bezüglich des Nährmediums liegen in einem Modellversuch allgemein vielfältige Fehlerquellen versteckt, die es erschweren, Ergebnisse mit der *in vivo* Situation zu vergleichen. Die Flussrate und Zusammensetzung des natürlichen Mediums Speichel sind nicht

konstant. Sie variieren u.a. in Verbindung mit der Nahrungsaufnahme. Außerdem befindet sich auf den Zähnen nur ein dünner Speichelfilm. Die Biofilme werden also nicht von einem großen konstanten Volumen an Nährmedium umgeben (Bradshaw *et al.* 1990; Bowden 1999). Realistischer wäre ein Beträufeln der Testkörper mit dem entsprechenden Medium (Wimpenny 1997).

Als Keim wurde in der vorliegenden Versuchsanordnung *Streptococcus sanguis* in einer Monokultur eingesetzt. Diese wurde gewählt, um der selbst gestellten Forderung nach einem möglichst einfachen Modell gerecht zu werden. Normalerweise besteht dentale Plaque aus einer Vielzahl von verschiedenen Bakterien. In der Literatur wird überall auf den Multispezies-Charakter von Biofilmen hingewiesen (Bradshaw *et al.* 1990; Gilbert *et al.* 1993; Herles *et al.* 1994; Bradshaw *et al.* 1995; Costerton 1995; Bradshaw *et al.* 1996; Gilbert *et al.* 1997). Von entscheidender Bedeutung ist dabei, dass mehrere Bakterienarten eine Symbiose eingehen können und somit ein anderes Verhalten zeigen als Monospezies-Kulturen wie: erhöhte Resistenz (Bradshaw und Marsh 1999) oder eine allgemeine Leistungsverbesserung (Costerton *et al.* 1995). Costerton (1995) spricht von einer Interspezies-Abhängigkeit. Es wird daher häufig gefordert, eine Keimsuspension aus 9 oder 10 verschiedenen Keimen einzusetzen, wobei diese das in der Mundhöhle vorkommende Spektrum möglichst breit gefächert abdecken sollen (Ten Cate und Marsh 1994; Sissons 1997; Dibdin und Wimpenny 1999; Wilson 1999). Nur so kann auf die *in vivo* Situation zurückgeschlossen werden, da die Multispezies-Kultur die Natur am ehesten imitiert (Larsen und Fiehn 1996; Pratten *et al.* 1998a). Hinsichtlich der Sequenz der Biofilmentstehung und der Zellzahl im Biofilm unterscheiden sich Mono- und Multispezies-Biofilme nicht (Bowden

1997). Was Studien mit Monospezies anbelangt, gibt es sehr unterschiedliche Meinungen. McLean *et al.* (1999) treffen die Aussage, dass häufig Monokulturen benutzt werden, obwohl sie für die *in vivo* Situation nicht relevant sind. Dagegen halten Bowden und Hamilton (1998) Monospezies-Biofilme für nicht ausreichend untersucht. Costerton *et al.* (1995) halten Studien sowohl mit Monospezies als auch mit Multispezies für gerechtfertigt.

Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass auch Monospezies-Biofilme wirkstoffabhängig unterschiedliche Resistenzen aufweisen und meistens resistenter als Planktonkulturen sind. Da das Modell nicht auf die *in vivo* Situation übertragen werden soll, erscheint der Einsatz einer Monokultur gerechtfertigt.

Einigkeit herrscht jedoch darüber, dass *S. sanguis* zu den ersten Siedlern an Oberflächen im oralen Bereich gehört (Coulter und Russel 1976; Marsh 1992, 1993; Marsh und Bradshaw 1993; Scheie 1994; Fine 1995; Larsen und Fiehn 1996; Wilson *et al.* 1996a; Liljemark *et al.* 1997; Wilson *et al.* 1998; Kolenbrander *et al.* 1999). Sein Vorkommen beschränkt sich nicht nur auf die *supragingivale* Plaque, sondern erstreckt sich auch auf den *subgingivalen* Bereich (Rosan *et al.* 1982a; Millward und Wilson 1989). Von Relevanz bei der Versuchsentwicklung ist außerdem, dass *S. sanguis* besser als andere Bakterienarten (z.B. *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*) an Oberflächen adhärert und Biofilme ausbildet. Rosan *et al.* (1982b) beziffern die erhöhte Affinität von *S. sanguis* im Vergleich zu *S. mutans* auf 10 bis 100. Durch seinen hohen metabolischen Quotienten erreicht *S. sanguis* hohe Zellzahlen (Bowden 1997) und ist damit für ein Modell gut als Testkeim geeignet (Appelbaum *et al.* 1979).

Als Wachstumszeit für die Biofilme wurden von uns 48 h angesetzt. Auch hier gehen die Meinungen in der Literatur stark auseinander.

Von Bedeutung ist das Biofilialter, da einige Autoren hierin eine Erklärung für die Resistenz von Biofilmen sehen. Alte Biofilme (7 d) sollen eine höhere Resistenz zeigen als junge Biofilme (2 d bzw. 4 d) (Anwar *et al.* 1990, 1992; Bradshaw *et al.* 1996; Schierholz *et al.* 1999). Wilson (1996) und Liljemark *et al.* (1997) definieren sogar 24 h alte Biofilme als jung. Dabei spielt die schnellere Anhaftung *in vitro* eine Rolle (Liljemark *et al.* 1997). Verschiedene Autoren halten 48 h alte Biofilme für Studienzwecke als ausreichend bzw. optimal (Larsen und Fiehn 1996). Obwohl die Keimquantität nach Herles *et al.* (1994) bis zu einer Zeit von 72 h zunimmt, halten sie eine Bebrütungszeit von 48 h für Routineexperimente für ausreichend. Pratten *et al.* (1998b) behaupten, dass das Wachstum nach 48 h konstant bleibt. Bowden (1997) empfiehlt für Monospezies-Biofilme sogar nur eine Wachstumszeit von 12 - 24 h, da nach dieser Zeitspanne ein Wachstumsplateau erreicht ist und eine weitere Bebrütung nur zu einer erhöhten Variabilität führt. Dem schließt sich Scheie (1994) mit einer empfohlenen Zeit von 30 h an. Diese Zeitangabe gilt speziell für Experimente, in denen das Nährmedium mit Saccharose versetzt ist.

Nach der vorgegebenen Einwirkzeit des Antiseptikums wurde der Biofilm für 30 min mit einem spezifischen Neutralisationsmittel behandelt. Dadurch soll erreicht werden, dass das Antiseptikum nur in der vorgegebenen Zeit seine Wirkung ausüben kann. Es ist hierfür erforderlich, dass das Neutralisationsmittel effektiv ist und keine toxische Wirkung auf die Biofilmzellen ausübt. Eigene Ergebnisse (s. Abschnitte **3.5** und **3.6 Ergebnisse**) belegen, dass beide Forderungen im Versuchsaufbau erfüllt sind.

Erstaunlicherweise finden sich in der Literatur nur wenige Studien, die diesen Aspekt berücksichtigen (Millward und Wilson 1989; Wilson *et*

al. 1996b; Thrower *et al.* 1997; Pratten *et al.* 1998a und b; Wilson *et al.* 1998; Pratten und Wilson 1999; Wilson 1999). Die meisten Autoren erwähnen kein Neutralisationsmittel. Diese Studien sind im Hinblick auf die Wirkung der Antiseptika kritisch zu bewerten (Prosser *et al.* 1987; Gristina *et al.* 1989; Anwar und Costerton 1990; Herles *et al.* 1994; Larsen und Fiehn 1996; Wilson *et al.* 1996a; Embleton *et al.* 1998).

Im vorgestellten Modell wurde nicht die MIC (minimal inhibitory concentration) bezüglich der Wirksamkeit der untersuchten Antiseptika ermittelt. MIC-Werte berücksichtigen weder, dass die Bakterien in einer Biofilmformation wachsen noch, dass die Einwirkzeit antimikrobieller Substanzen durch Neutralisationsverfahren zu begrenzen ist (Millward und Wilson 1989; Wilson 1996; Wilson *et al.* 1998). Somit liefert die MIC keine aussagekräftigen Werte (Wilson *et al.* 1996b; Pitten und Kramer 1999). Pratten *et al.* (1998b) warnen vor einer Übertragung der MIC-Werte auf die Biofilmsituation. Dennoch muss die MIC ihrer Meinung nach als Richtwert herangezogen werden, da aufgrund nicht vorhandener Forschungsergebnisse keine anderen Vergleichsmöglichkeiten gegeben sind.

Im weiteren Procedere, nach Einwirkung der Antiseptika und deren Inaktivierung durch ein spezifisches Neutralisationsmittel, mussten die Biofilme von den Hydroxylapatit-Plättchen entfernt und die Biofilmstruktur „aufgebrochen“ werden. Nach Möglichkeit sollen danach nur einzelne Zellen vorliegen. Diese werden dann in geeigneter Weise verdünnt und zur Keimzahlbestimmung auf Blut-Agar-Platten ausplattiert.

Als Vorgehensweise zur Biofilmentfernung von Oberflächen bietet die Literatur drei Verfahren an, die z.T. alle miteinander kombiniert

werden. Als einfachste Möglichkeit wird das Abkratzen des Biofilms mit einem sterilen Skalpell vorgestellt (Khoury *et al.* 1992). Diese Methode erscheint jedoch nicht praktikabel, da hier viele Fehlermöglichkeiten begründet liegen. Das Plättchen muss während des Kratzvorgangs festgehalten werden, durch das Kratzen selbst kann die Oberfläche des Plättchens verletzt werden und der Biofilm ist nicht in einzelne Zellen zerteilt. Das zuletzt genannte Problem umgehen die Autoren dadurch, dass sie die beiden nächsten Verfahren zusätzlich einsetzen. Es handelt sich dabei um das Durchmischen auf einem Vortexmixer und die Behandlung in einem Ultraschallbad.

Ein Großteil der vorgestellten Studien schlägt eine alleinige Behandlung der Biofilme mittels des Vortexmischers vor. Diese Methode soll effizient genug sein, um den Biofilm von der Oberfläche ablösen und in Einzelzellen zerteilen zu können. Es werden jedoch unterschiedliche Zeitangaben für das Durchmischen gemacht. Die Angaben schwanken zwischen 30 s (Millward und Wilson 1989; Bradshaw *et al.* 1996; Kinniment *et al.* 1996), 1 min (Johnston und Jones 1995; Wilson *et al.* 1996a und b; Thrower *et al.* 1997; Embleton *et al.* 1998; Pratten *et al.* 1998a und b; Wilson *et al.* 1998; Pratten und Wilson 1999; Wilson 1999) und 2 min (Allison *et al.* 1999). Johnston und Jones (1995) vertreten die Ansicht, dass das Vortexen mehr Zellen von der Oberfläche entfernt als die Methode des Abkratzens. Dennoch sollen schlecht entfernbare und hoch resistente Zellen der Filmbasis auf den Plättchen haften bleiben. Hinzu kommt, dass die Durchmischung auf dem Vortexmixer das Absterben einer gewissen Anzahl an Zellen zur Folge haben soll, so dass Vorsicht bei der Einschätzung der Antiseptikawirksamkeit geboten ist. Ähnliche Ansichten werden auch bei der Anwendung von Ultraschall vertreten. Abscherkräfte (McLean *et al.* 1999) und Kavitationsblasen (Stickler 1999) sollen bei diesem Verfahren für eine effektive mechanische

Reinigung sorgen. Dabei können die Zellen durch Zerstörung der Zellwand oder Hitzeentwicklung getötet werden (McLean *et al.* 1999). Die Empfehlung der Autoren lautet, verschiedene Ultraschallbehandlungszeiten auszuprobieren und die Zeit zu wählen, bei der die meisten Zellen nachweisbar sind. Costerton *et al.* (1987) schlagen vor, die Biofilmzellen durch Vortexen und anschließende moderate Ultraschallbehandlung von den Oberflächen zu entfernen. Sie haben ermittelt, dass die Zellzahl mit dieser Methode um 1 log-Stufe unter der Zahl liegt, die man durch Direktzählung nach Anfärbung mit Acridin-Orange erhält. Die Autoren erklären sich dieses Phänomen durch eine unvollständige Entfernung und Zerkleinerung des Biofilms und ein Absterben von Zellen durch das Vortexen und die Ultraschallbehandlung. Das Ergebnis der quantitativen Auswertung sollte daher nur als ein Minimum angesehen werden. Gilbert *et al.* (1993) weisen darauf hin, dass die Exopolysaccharide der Biofilmmatrix auch nach einer Ultraschallbehandlung wie ein Fingerabdruck auf der Testoberfläche haften bleiben. Eginton *et al.* (1995) halten dagegen das Verfahren der Ultraschallbehandlung für zu ungenau. Eine komplett andere Ansicht vertreten Qian *et al.* (1997) sowie Johnson *et al.* (1998). Ihrer Ansicht nach werden die Biofilme vollständig von Oberflächen entfernt und keine Zellen getötet, wenn man eine Ultraschallbehandlung mit hoher Intensität durchführt. Qian *et al.* (1997) gehören dabei zu den wenigen Autoren, die konkrete Zahlen für die Zeit und die Intensität nennen. Sie empfehlen 5 min Behandlungszeit bei einer Intensität von 3 W/cm^2 . Weitere Vorschläge bieten Zinn *et al.* (1999) mit einer Zeit von drei mal 1 s bei einer Leistung von 20 W. Gong *et al.* (1998) empfehlen ebenfalls eine dreistufige Behandlungszeit von jeweils 3 s. Sie machen jedoch keine Angaben zur Ultraschallintensität. Ebenso verhält es sich bei den Autoren Prosser *et al.* (1987) mit 1 min

Vortexen und 5 min leichter Ultraschallbehandlung sowie Gristina *et al.* (1989) mit 5,5 min Ultraschall- und 30 s Vortexzeit. Noch ungenauere Angaben machen Herles *et al.* (1994) sowie Larsen und Fiehn (1996). Sie sprechen generell nur von einer kurzen Ultraschallbehandlung bei geringer Leistung.

Die eigenen Ergebnisse haben gezeigt, dass eine Ultraschallbehandlung keinen Einfluss auf *S. sanguis*-Zellen hat (s. Abschnitt **3.1 Ergebnisse**). Der Vorversuch zur Validierung der Ultraschallwirkung auf die Hydroxylapatit-Plättchen (s. Abschnitt **3.2 Ergebnisse**) hat jedoch gezeigt, dass bei einer 10-minütigen Ultraschallbehandlungszeit Abnutzungserscheinungen an den Plättchen zu erkennen waren. Bei Anwendung der Vortex- und Ultraschallbehandlung auf Plättchen mit Biofilmbewuchs ließ sich bei einer Zeit von jeweils 30 s makroskopisch kein Biofilmrückstand mehr erkennen. In Bezug auf die vollständige Zerkleinerung der Biofilme in einzelne Zellen konnte beobachtet werden, dass die Biofilme in sehr kleinen, aber makroskopisch sichtbaren Stücken vorlagen, unabhängig von der Vortex- und Ultraschallzeit. Das stimmt mit der Feststellung von Costerton *et al.* (1987) überein (s.o.).

Für die Verdünnungsreihen zum Ausplattieren der Zellen wurde eine Pufferlösung mit dem pH-Wert 7,2 verwendet. Diese Methode wird von Appelbaum *et al.* (1979), Anwar *et al.* (1989) sowie Anwar und Costerton (1990) empfohlen, um die Zellen zu waschen. Dibdin und Wimpenny (1999) benutzen den Puffer zur Neutralisation von Säuren im Biofilm. Das ist allerdings bei einem Monospezies-Biofilm mit *S. sanguis* nicht relevant, da der Keim nicht zu den Säurebildnern zählt (Marsh 1999).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Hunderte von Parametern an einem *in vitro* Testsystem und damit auch am vorgestellten eigenen Modell das Wachstum und die Zusammensetzung dentaler Plaque beeinflussen. Als Folge davon ist sicherlich auch die Wirksamkeit von antimikrobiellen Substanzen betroffen.

4.2 Ergebnisse der Antiseptikatestung, Wirkungsweise der verwendeten Substanzen und Resistenzmechanismen

Biofilmzellen haben eine bemerkenswerte Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen im Vergleich zu planktonisch gelösten Bakterien (Prosser *et al.* 1987; Anwar *et al.* 1989; Gristina *et al.* 1989; Ten Cate und Marsh 1994; Costerton 1995; Gilbert 1995; Johnston und Jones 1995; Marsh und Bradshaw 1995; Bradshaw *et al.* 1996; Larsen und Fiehn 1996; Wilson 1996; Wilson *et al.* 1996a; Bowden und Li 1997; Gilbert *et al.* 1997; Qian *et al.* 1997; Sissons 1997; Thrower *et al.* 1997; Williams und Pitt 1997; Embleton *et al.* 1998; Pratten *et al.* 1998a und b; Wilson *et al.* 1998; Bradshaw und Marsh 1999; Costerton 1999; Dibdin und Wimpenny 1999; Kharazmi *et al.* 1999; Marsh 1999; McLean *et al.* 1999; Schierholz *et al.* 1999; Stickler 1999; Wilson 1999; Zilver *et al.* 1999).

Diese Beobachtung konnte mit den eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Das erarbeitete System erlaubt die Untersuchung der Keimzahlreduzierung anhand verschiedener Testsubstanzen, Dosierungen und Einwirkzeiten, übereinstimmend mit der Literatur (Gjerme 1989). Dabei wurden auch klinisch wenig relevante Konzentrationen der Antiseptika untersucht. Dies sollte zur Verdeutlichung der Funktionalität des Modells beitragen. Zur

Anwendung kamen die Substanzen Chlorhexidindigluconat als Goldstandard (Marsh 1992), Polyvidon-Iod und Octenidin. Es ist zu beachten, dass die beiden zuletzt genannten Substanzen nicht in ihrer reinen Form getestet wurden, sondern in einem gebrauchsfertigen Präparat (s. Anhang) inkorporiert waren. Nur das Chlorhexidindigluconat kam in reiner Form zur Anwendung. Pratten *et al.* (1998a) weisen darauf hin, dass Vergleiche zwischen verschiedenen Mundspüllösungen schwierig sind, weil sie oft Zusatzstoffe wie Fluoride etc. enthalten, die die Effektivität des Mittels erhöhen oder verringern können. Ähnlich formulieren Kramer *et al.* (1998), dass geschmacksverbessernde Stoffe die antiseptische Wirksamkeit vermindern können. Thrower *et al.* (1997) haben beobachtet, dass reine Antiseptika immer etwas wirkungsvoller waren als Fertigprodukte, da Inhaltsstoffe die Wirksamkeit vermindern.

Unter den getesteten Substanzen war Chlorhexidin das effektivste Mittel bezüglich der Biofilmreduktion. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer *in vitro* Systeme in der Literatur überein (Gjerme 1989; Netuschil *et al.* 1989; Scheie 1989; Brex *et al.* 1990; Fine 1995; Larsen und Fiehn 1996; Thrower *et al.* 1997; Pratten *et al.* 1998a und b; Schierholz 1999). Marsh (1993) kommt zu einer ähnlichen Einschätzung. Er bewertet die Effektivität anhand eines hohen Kariesrückgangs.

Octenidin in Form einer Mundspüllösung konnte orale aerobe Bakterien um 3,0 log-Stufen reduzieren. Dieses Ergebnis bezieht sich auf Messungen direkt nach der Applikation (Kramer *et al.* 1998). Auch andere *in vivo* Studien konnten eine gute Wirksamkeit beobachten (Patters *et al.* 1983, 1986). Patters *et al.* (1986) halten Octenidin für genauso wirksam wie Chlorhexidin. In der vorliegenden Studie wurden deshalb ähnliche Ergebnisse erwartet. Es ließ sich

jedoch für Octenidin nur eine moderate Aktivität gegenüber sessilen Bakterien feststellen. Das Maximum lag bei einer Reduktion um 1,9 log-Stufen bei einer Einwirkzeit von 30 min, obwohl es sich um die 0,1%-ige Anwendungskonzentration handelt, die in der Mundhöhle durch den Speichelfluss rasch unterschritten werden dürfte.

PVP-Iod zeigte dagegen einen deutlichen Effekt auf Biofilmbakterien, obwohl in der Literatur gegensätzliche Darstellungen über seine Anti-Plaque-Wirksamkeit existieren (Saxen *et al.* 1976; Addy *et al.* 1977; Fine 1985).

Die Wirkungsweise von Chlorhexidin wird in der Literatur über die unterschiedlichsten Mechanismen erklärt. Zunächst bindet das Chlorhexidin infolge hydrophober und elektrostatischer Wechselwirkungen an hydrophobe und hydrophile Oberflächen (Pratten *et al.* 1998b). Genauer gesagt kommt es zu einer Beziehung zwischen dem positiv geladenen Chlorhexidin und der negativ geladenen Matrix (Gjerme 1989). Da Chlorhexidin zu den Bisbiguaniden gehört, wirkt es über die molekulare Geometrie und die hydrophil-lipophile Balance des Moleküls (Gjerme 1989). Der eigentliche Wirkort ist die Zytoplasmamembran (Gilbert und Brown 1980). Durch Verlust des osmotischen Gleichgewichtes kommt es in niedriger Konzentration bis etwa 200 µg/ml (Kramer 2001) zur Abstoßung der Zytoplasmamembran (Detergenzwirkung) mit nachfolgender Präzipitation des Zytoplasmas (Netuschil *et al.* 1989; Marsh 1992; Kramer 2001). In höherer Konzentration werden Nukleinsäuren und Proteine im Zytoplasma ausgefällt und es tritt eine ausgeprägte Adsorption an Mikroorganismen mit Veränderung der elektro-phoretischen Mobilität auf (Kramer 2001). Des Weiteren beeinflusst Chlorhexidin die Glucosyltransferase, die für die

bakterielle Adhäsion an Oberflächen von Bedeutung ist, und entfernt bestehende Plaque bei täglich sechs Spülungen mit 0,2%-iger Lösung bzw. verhindert eine Säureentstehung in der Plaque (Gjeramo 1989). Über die Verhinderung der Plaqueentstehung gibt es kontroverse Meinungen. Nach Gjeramo (1989) müsste für eine erfolgreiche Plaqueverhinderung eine 99%-ige Wirkung von Chlorhexidin ausgehen. Da nach einer Chlorhexidingabe jedoch nur 50 bis 90% der Bakterien getötet würden, ist nicht mit einer Verhinderung der Plaquewirkung zu rechnen. Coulter und Russel (1976) konnten dagegen bei Verwendung einer 0,2%-igen Chlorhexidinlösung 2x/d, bei einer Konstanthaltung des pH-Wertes, eine Verhinderung der Plaquebildung beobachten. Als Wirkungsoptimum wird ein pH-Bereich von 5,5 - 7,0 genannt (Kramer 2001). Im Speziellen geht man davon aus, dass das PEP-PTS Zucker-Transport-System gehemmt wird (McDermid *et al.* 1989; Marsh 1999). Dabei soll Chlorhexidin selektiv wirksam sein (Coulter und Russel 1976; Marsh 1993). Während das PEP-PTS Zucker-Transport-System bei *S. mutans* eine Rolle spielt (Marsh 1999), werden in *S. sanguis* die Argininaufnahme und der Argininkatabolismus gehemmt (Marsh 1992).

Wichtig für die Wirkung ist die Substantivität, d.h. die Anhaftung des Mittels an Oberflächen (Scheie 1989). Das kationische Chlorhexidin hat eine starke Affinität zu Mucin im Speichel und wird durch elektrostatisch reversible Bindung an Glykoproteine gespeichert. Hauptspeicher sind Weichgewebe und Plaque (Gjeramo 1989), aber auch die Zahnoberflächen (Pratten *et al.* 1998a). 30% des Wirkstoffes werden dabei gebunden und erst nach und nach abgegeben, so dass noch nach 24 h eine Wirkung nachweisbar ist (McDermid *et al.* 1987; Gjeramo 1989). Die übrigen 70% werden verschluckt oder abgeatmet, so dass die Wirkung nur von der Konzentration auf der Oberfläche

abhängt (Marsh 1992). Es ist jedoch zu beachten, dass das Chlorhexidin an den Oberflächen nur *adsorbiert* und nicht *absorbiert* wird, so dass zwar eine lange Wirkung zu beobachten ist, aber nicht in tiefen Schichten der Plaque (Coulter und Russel 1976; Netuschil *et al.* 1989; Pitten und Kramer 1999). Zum Eindringen in die Plaque benötigt Chlorhexidin mindestens 20 min (Coulter und Russel 1976). Aus den eben genannten Gründen wurde in der vorliegenden Studie eine Einwirkzeit von 30 min gewählt. Larsen und Fiehn (1996) weisen jedoch darauf hin, dass Chlorhexidin nur lokal angewendet wird. Daher soll eine wesentlich schnellere Verdünnung der Substanz erfolgen als bei systemisch applizierten Antibiotika. Dies ist sicher richtig, jedoch sind Antibiotika nicht mit Antiseptika zu vergleichen. Kramer *et al.* (1998) machen deutlich, dass eine antiseptische Mundspülung die Keimzahlen um 1 - 3 log-Stufen senken kann. Das ist wichtig bei Risikopatienten und chirurgischen Eingriffen, jedoch ersetzt die Antiseptik nicht eine antibiotische Prophylaxe (Kramer *et al.* 1998).

Einen interessanten Hinweis bezüglich der Wirksamkeit von Chlorhexidin geben Wilson *et al.* (1998). Sie konnten nachweisen, dass ein saccharosehaltiges Medium eine deutlich höhere Chlorhexidin-Effektivität zur Folge hat. Die Reduktion war von 53% ohne Saccharose auf 89% mit Saccharose im Nährmedium gestiegen. Kramer (2001) hingegen weist auf Wechselwirkungen hin, wonach es in Gegenwart von Saccharose zu einer Wirkungsverminderung kommt. Die Wirksamkeit wird außerdem durch Serum, Eiter, Blut, außerhalb des Optimums liegende pH-Werte (s.o.), hartes Wasser, anionenaktive Detergenzien, Tween 80 (Bestandteil des im Versuchsansatz verwendeten Neutralisationsmittels, s. Anhang) etc. vermindert (Kramer 2001).

Allgemein bekannt sind die Nebenwirkungen (Marsh 1993) von Chlorhexidin: schlechter Geschmack und Verfärbung der Zähne bei längerer Anwendung (Thrower *et al.* 1997). Einen sehr detaillierten Überblick über die Nebenwirkungen gibt Gjerme (1989): Er berichtet über Geschmacksveränderungen, die er durch eine Denaturierung von Oberflächenproteinen auf Geschmacksknospen erklärt. Auch er weist darauf hin, dass Geschmackszusätze die Wirksamkeit von Chlorhexidin vermindern können (s.o.). Eine weitere Nebenwirkung besteht in der Verfärbung von Zähnen, Füllungen und Weichgeweben. Diese Verfärbung soll leicht entfernbar sein. Es handelt sich wahrscheinlich um denaturiertes Protein, Fe-Sulfid, Sn und S in der Pellicle. Die Dicke der Pellicle soll direkt proportional zur Stärke der Verfärbung sein. Chlorhexidin führt weiterhin zu Desquamation und wunden Gewebeoberflächen. Dies ist die Folge der Präzipitation von Mucin, so dass in der Mundhöhle kein lubrikativer Effekt mehr vorliegt. In direktem Zusammenhang zur Mucinpräzipitation steht eine reduzierte Immunabwehr. Diese folgt aus einer Abnahme von IgA, das in der Mucinschicht der Gewebe gespeichert ist. Es ist jedoch kein Effekt bezüglich der Störung von Wundheilungen bekannt. Nach Kramer (2001) wird Chlorhexidin sogar zur Reduktion postoperativer Wundheilungsstörungen nach oralchirurgischen Eingriffen verwendet. Als unerwünschte Wirkungen sind eine chromosomale und plasmidische Resistenzentwicklung und die tierexperimentell belegte Induktion prämaligener Veränderungen bekannt (Kramer 2001). Deshalb soll die Anwendung von Chlorhexidin nur kontrolliert und nicht länger als 14 d erfolgen. Systemische Nebenwirkungen sind selten.

Octenidin ist ein Bispyridin-Derivat (Patters *et al.* 1986; Scheie 1989). Die Wirksamkeit wird mit der von Chlorhexidin verglichen (Gjerme

1989; Patters *et al.* 1986). In der Mundhöhle soll Octenidin die Wirksamkeit von Chlorhexidin sogar signifikant übertreffen (Kramer 2001).

Der Wirkungsmechanismus wird beschrieben als Reaktion mit Polysacchariden der Zellwand von Mikroorganismen und Eingriff in enzymatische Systeme. Daraus resultiert eine Zerstörung der Zellfunktion (Kramer 2001).

Als Nebenwirkungen sind eine dem Chlorhexidin ähnliche Verfärbung der Zähne und eine Desquamation bekannt (Patters *et al.* 1986). Die Verfärbung trat in ihren Versuchen jedoch nur auf, wenn keine zusätzliche mechanische Zahnreinigung stattfand. Durch eine Politur der Zähne mit einem Gummikelch waren die Verfärbungen entfernbar. Die Desquamation ähnelte einer chemischen Verbrennung. Außerdem waren die Caruncula der Glandulae submandibulares geschwollen. Erstaunlicherweise traten die genannten entzündlichen Beschwerden nur bei einer mit Wasser verdünnten Octenidinlösung auf. Wurde Octenidin in einem Vehikel gelöst verabreicht, traten die Beschwerden nicht auf, und es ließ sich keine signifikant reduzierte Aktivität des Wirkstoffes beobachten. Durch seinen schlechten Geschmack wird Octenidin in der Mundhöhle schlechter toleriert als Chlorhexidin. Auf längere Sicht muss daher eine Rezepturänderung vorgenommen werden. *In vitro* Tests haben gezeigt, dass Octenidin die Zytotoxizität von Chlorhexidin übertrifft. Aus diesem Grund und wegen fehlender Erfahrungen im Vergleich zu etablierten Antiseptika sollte Octenidin nicht im Dauergebrauch eingesetzt werden (Kramer 2001).

PVP-Iod ist ein Antiseptikum, das in die Gruppe der Halogene einzuordnen ist. Es handelt sich um eine Verbindung, aus der Iod abgespalten wird, wodurch ein Reservoir für aktives Iod besteht.

In der Mundhöhle ist die Remanenz von PVP-Iod jedoch nicht ausreichend vorhanden. Das konnten Pitten und Kramer (1999) nachweisen. 1 h nach Anwendung von PVP-Iod betrug die Reduktion weniger als 1 log-Stufe. Bezüglich der sofort einsetzenden Wirkung wird PVP-Iod jedoch als sehr gut wirksam beschrieben. Der Reduktionsfaktor liegt bei mehr als 1,5 log-Stufen, was mit der Wirkung von Chlorhexidin vergleichbar ist. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Maruniak *et al.* (1992). Sie behaupten sogar, dass PVP-Iod, genau wie Chlorhexidin, bei täglich zweimaliger Anwendung als Spüllösung Plaque und Gingivitis effektiv reduziert. Es ist jedoch zu beachten, dass Maruniak *et al.* (1992) Perimed[®] benutzt haben, ein Präparat, das neben PVP-Iod zu gleichen Teilen auch Wasserstoffperoxid enthält.

PVP-Iod wird jedoch in der Zahnmedizin nur zur Schleimhautantiseptik vor Zahnextraktionen, intraoralen Operationen, Scaling oder zur Aerosol-Reduktion verwendet (Pitten und Kramer 1999).

Zu beachten ist eine mögliche Iodallergie, so dass PVP-Iod nicht uneingeschränkt anwendbar ist.

Wie schon oben angesprochen, sind Biofilme gegen antimikrobielle Wirkstoffe resistenter als planktonisch gelöste Zellen. Dieses Phänomen resultiert u.a. daraus, dass oberflächenassoziierte Bakterien völlig neue Eigenschaften haben (Marsh und Bradshaw 1995). In der Literatur wird diese Resistenz sehr unterschiedlich bewertet. In Abhängigkeit vom Biofilm und von den getesteten antimikrobiellen Mitteln wird die Resistenz als 20- bis 5000-fach gegenüber planktonisch gelösten Zellen beziffert (Brown *et al.* 1988; Gilbert *et al.* 1990; Khoury *et al.* 1992; Costerton 1997; Kharazmi *et al.* 1999; Stickler 1999). Die Resistenz kann nach Costerton (1999) im

menschlichen Körper sogar noch größer sein als *in vitro*. Dabei soll die Empfindlichkeit von Tag zu Tag als Folge der Unterschiede der Katalase-Aktivität und der Sauerstoffkonzentration im Biofilm schwanken (Johansen *et al.* 1997). Ebenso unterschiedlich wie die Resistenzangaben sind die Erklärungsversuche über das Zustandekommen der Unempfindlichkeit (Wilson 1996):

a) Struktur des Biofilms

Hier spielen sowohl die makroskopische als auch die mikroskopische Struktur eine Rolle. Makroskopisch bedeutet, dass nur ein intakter Biofilm eine Resistenz aufweist (Gilbert *et al.* 1997). Durch Vortexen oder Ultraschallbehandlung zerstörte Biofilme zeigen eine gleich geringe Resistenz wie planktonisch gelöste Zellen (Costerton *et al.* 1995; Dibdin und Wimpenny 1999). Johnston und Jones (1995) weisen ebenfalls auf dieses Phänomen hin, weil man sonst leicht die Wirksamkeit eines Antiseptikums überschätzen kann. Mikroskopisch gesehen geht man davon aus, dass sich ein Biofilm prinzipiell in zwei Bereiche aufteilen lässt. Zum einen in eine Filmbasis, die homogen dicht gepackte Zellen enthält und in Kontakt steht mit einer auf einer Oberfläche adsorbierten Schicht. Ein Stofftransport erfolgt durch Diffusion. Zum anderen soll eine viskoelastische, oberflächliche Filmschicht existieren, die mit der flüssigen Phase in Verbindung steht, weniger dicht gepackte Zellen und, aufgrund einer heterogen porösen Struktur, mehr Flüssigkeit enthält. In dieser Schicht funktioniert ein Transport advektiv (Peyton und Characklis 1995). Anwar *et al.* (1992) vergleichen die oberflächlichen Biofilmschichten mit planktonischen Zellen: dort haben die Zellen eine hohe Teilungsrates, normale Größe und ein ausreichendes Sauerstoffangebot. Die Zellen der tiefen Schichten dagegen sind

klein und haben nur eine geringe Teilungsrate. Diese Art der Strukturierung soll es dem antimikrobiellen Mittel erschweren, alle im Biofilm enthaltene Zellen zu erreichen und zu vernichten. Bleibt auch nur eine Zelle oder eine Mikrokolonie am Leben, wird ein Biofilm immer wieder entstehen (Bowden und Hamilton 1998; Costerton *et al.* 1999). Diese Theorie ist eng an die nächste angelehnt.

b) Der Biofilm als Penetrationsbarriere

Damit eine Substanz wirken kann, muss sie die Biofilmmatrix penetrieren. Nur so kann sie an den eigentlichen Wirkort gelangen. Ein oft diskutierter Grund für die verminderte Resistenz des Biofilms ist die extrazelluläre Matrix (Costerton *et al.* 1987; Brown *et al.* 1988; Anwar *et al.* 1989, 1990; Gilbert *et al.* 1990; Costerton *et al.* 1994; Costerton 1999). Zellkomponenten und Produktion von Enzymen und Polysacchariden sollen Antiseptika hemmen. Hinzu kommt eine mögliche Strukturvarianz der Matrix (Gilbert *et al.* 1997). Einer weiteren Theorie nach soll die Matrix als molekulares Sieb wirken, indem es zu einer Ioneninteraktion zwischen der negativ geladenen Matrix und dem positiv geladenen Antiseptikum kommt (Brown und Williams 1985; Dibdin und Wimpenny 1999). Die polyanionische Glykokalyx fungiert damit als Diffusionsbarriere (Netuschil *et al.* 1989; Hoyle *et al.* 1990; Khoury *et al.* 1992; Ten Cate und Marsh 1994; Larsen und Fiehn 1996; Costerton 1997; Qian *et al.* 1997; Sissons 1997; Costerton *et al.* 1999; Dibdin und Wimpenny 1999; Gottenbos *et al.* 1999; Kharazmi *et al.* 1999; McLean *et al.* 1999; Schierholz *et al.* 1999; Stickler 1999). Außerdem ist auch eine chemische Reaktion zwischen den beiden genannten Komponenten denkbar. Eine alleinige chemische Reaktion (Ionenaustausch) und nicht die

Glykokalyx per se, sehen Brown und Gilbert (1993) für einen möglichen Resistenzmechanismus an. In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, wie die Matrix aus chemischer Sicht zusammengesetzt und wie viel Matrix überhaupt vorhanden ist. Nach Davies *et al.* (1998) soll ein dünner „unvollkommener“ Biofilm genauso empfindlich auf Antiseptika reagieren wie planktonische Zellen. Auch die physikochemischen Eigenschaften und die chemische Reaktivität des antimikrobiellen Wirkstoffes sind von Interesse. Konkret heißt das, dass Dipol-, H- oder Ionenbindungen sowie Komplexe entstehen können, die das antimikrobielle Mittel inaktivieren (Millward und Wilson 1989; Schierholz *et al.* 1999). Embleton *et al.* (1998) sprechen von einer Diffusionslimitierung in Verbindung mit elektrostatischer Abstoßung und hydrophoben Interaktionen. Wilson (1996) geht jedoch davon aus, dass die Matrix bei einem Überschuss an Antiseptikum irgendwann gesättigt ist, d.h. dass alle Bindungsstellen belegt sind, und somit kein Schutzmechanismus mehr vorhanden ist. Des Weiteren kann es auch Substanzen geben, die sehr kleine oder ungeladene Moleküle enthalten. Auch hier wäre kein Schutz der Biofilmzellen durch die Matrix zu erwarten. Nichols (1989) konnte in einer Studie über die Diffusion des positiv geladenen Antibiotikums Tobramycin durch die negativ geladene Alginsäure-Matrix von *Ps. aeruginosa* nur eine um ein Drittel verminderte Diffusionsrate feststellen. Demnach ist es unwahrscheinlich, dass die Matrix allein für die etwa 1000-fach verminderte Empfindlichkeit der Biofilmzellen gegenüber den planktonisch gelösten Zellen verantwortlich sein soll. Zu einem ähnlichen Schluss kommen auch Gristina *et al.* (1989).

c) Wachstumsrate von Biofilmzellen

Eine alternative Hypothese zur verminderten Empfindlichkeit von Biofilmzellen gegen antimikrobielle Mittel haben Brown *et al.* (1988) formuliert. Die Zellen im Biofilm wachsen sehr langsam (Prosser *et al.* 1987; Schierholz *et al.* 1999) und stellen so eine quasi stationäre Phase dar, d.h. tief im Biofilm gelegene Zellen sind physiologisch inaktiv (Stickler 1999), da dort nur Nährstoffe ankommen, die die oberen Schichten passieren konnten (sog. cross-feeding) (Gilbert *et al.* 1997). Solche langsam wachsenden Zellen sind relativ unempfindlich, wenn sie mit antimikrobiellen Substanzen in Berührung kommen (Brown 1977; Brown und Williams 1985). Mit anderen Worten steigt bei einer langsamen Zellteilung, was mit einer verminderten Wachstumsrate gleichzusetzen ist (Brown *et al.* 1990), die Resistenz an (Gilbert und Brown 1980; Brown und Williams 1985; Anwar *et al.* 1990; Gilbert *et al.* 1990; Hoyle *et al.* 1990; Brown und Gilbert 1993; Costerton *et al.* 1995; Pratten *et al.* 1998b; Costerton *et al.* 1999; McLean *et al.* 1999).

d) Einflussfaktoren aus der Mikroumgebung

Man muss davon ausgehen, dass jede Biofilmpopulation eine unterschiedliche Wachstumsrate oder antibakterielle Resistenz zeigt. Aus dieser physiologischen Diversifikation (Costerton *et al.* 1987; Brown *et al.* 1990) könnten in den oberflächlichen Schichten des Biofilms sog. „Wächter-Zellen“ entstehen, die Antibiotika enzymatisch neutralisieren (Hoyle *et al.* 1990; Larsen und Fiehn 1996). Denkbar wäre hier eine Inaktivierung durch β -Lactamase, die von den Bakterienzellen sezerniert und in der Matrix gesammelt exponiert wird.

Auch Abfallprodukte der Bakterien könnten sich in der Matrix ansammeln und antimikrobielle Substanzen inaktivieren, indem sie beispielsweise den pH-Wert entsprechend verändern (Wilson 1996).

e) Veränderte Genexpression

Es wird vermutet, dass Zellen, die in einem Biofilm wachsen, einen veränderten Phänotyp besitzen (Millward und Wilson 1989; Gilbert *et al.* 1990; Hoyle *et al.* 1990; Khoury *et al.* 1992; Brown und Gilbert 1993; Gilbert *et al.* 1993; Costerton *et al.* 1994; Ten Cate und Marsh 1994; Costerton 1995; Costerton *et al.* 1995; Larsen und Fiehn 1996; Sissons 1997; Bowden und Hamilton 1998; Amano *et al.* 1999; Bradshaw und Marsh 1999; Costerton 1999; Stickler 1999). Danach sollen verschiedene Genexpressionen induziert (Schierholz *et al.* 1999) oder reprimiert werden, was zu einer reduzierten Empfindlichkeit im Biofilm führt (Gilbert *et al.* 1990; Costerton *et al.* 1994; Amano *et al.* 1999; Marsh 1999; Zilver *et al.* 1999). Costerton (1995) und Costerton *et al.* (1995) sprechen von einer Induktion einer großen Genkassette, die von einem σ -Faktor gesteuert wird. Es sollen hauptsächlich Enzyme über die veränderte Genexpression synthetisiert werden. Eine Änderung des Phänotyps stellt eine Antwort auf Veränderungen der Umgebungsbedingungen dar (Brown und Williams 1985; Brown *et al.* 1988; Anwar *et al.* 1989; Hoyle *et al.* 1990). Die Bakterien besitzen eine hohe Plastizität in Struktur und Physiologie, so dass eine Phänotypänderung schnell erfolgt (Gilbert *et al.* 1993; Costerton *et al.* 1995; Gilbert *et al.* 1997). Als Resultat liegt in Biofilmen eine breite Streuung des Phänotyps vor (Gilbert *et al.* 1997).

f) Alter des Biofilms

Millward und Wilson (1989), Anwar *et al.* (1990, 1992), Bowden und Li (1997), Gilbert *et al.* (1997) sowie Dibdin und Wimpenny (1999) sehen im Biofilmalter das Problem der Resistenz. Entsprechende Experimente haben gezeigt, dass 24 h alte Biofilme viel empfindlicher auf antimikrobielle Substanzen reagieren als 72 h alte Biofilme (Anwar und Costerton 1990). Entscheidend ist dabei die Kolonienzahl und -dichte (Gilbert *et al.* 1987; Wilson 1996; Schierholz *et al.* 1999; Stickler 1999). Demgegenüber steht die Meinung von Bowden und Hamilton (1998), dass das Alter des Biofilms keine Rolle im Hinblick auf die Resistenz spielt. Auch Prosser *et al.* (1987) konnten in ihren Experimenten beobachten, dass 48 h und 72 h alte Biofilme gleichermaßen reduziert wurden. Sie schließen daraus, dass das Biofilmalter keine Rolle spielt. Ähnliche Ergebnisse konnten Wilson *et al.* (1996b) sowie Schierholz *et al.* (1999) mit 7 d und 4 d alten Biofilme erzielen.

Wie aus den aufgeführten Meinungen hervorgeht, wird das Problem der Biofilmresistenz in der Literatur kontrovers diskutiert. Embleton *et al.* (1998) sind beispielsweise der Meinung, dass die Resistenz nicht aus einer veränderten Wachstumsrate, einem veränderten pH-Wert oder der Bindung an die Exopolysaccharide der Matrix resultiert. Ähnlich argumentieren Gristina *et al.* (1989). Sie machen für die Resistenz eine relative Biomaterialspezifität verantwortlich, über die die Quantität der Bakterienanhaftung gesteuert wird. Hinzu kommen eine verminderte metabolische Rate, physiologische Unterschiede und substratinduzierte phänotypische Veränderungen. Interessanterweise wird auch von diesen Autoren die Effizienz der polyanionischen Matrix, antimikrobielle Substanzen von den Biofilmzellen fernhalten zu können, infrage gestellt.

Prosser *et al.* (1987) behaupten sogar, kein Mittel könne einen Biofilm vollständig reduzieren. In eine ähnliche Richtung geht die Behauptung, dass durch antimikrobielle Substanzen keine Beeinflussung der Plaquebildung möglich ist, weil die bakterielle Multiplikation zu schnell abläuft (Gjerme 1989). Anwar *et al.* (1990) schieben das Versagen eines Antiseptikums nur auf eine zu geringe Konzentration. McDermid *et al.* (1985) weisen darauf hin, dass Chlorhexidin hochkonzentriert bakteriozid und niedrig konzentriert bakteriostatisch wirkt. Allerdings können Antiseptika nicht in einer beliebig hohen Konzentration verabreicht werden, da oft Nebenwirkungen bestehen. Es wird daher sogar eine möglichst geringe Dosierung für Chlorhexidin gefordert (Thrower *et al.* 1997).

Die oben aufgeführten möglichen Resistenzmechanismen sind selbstverständlich nicht alle ohne weiteres auf die *S. sanguis*-Monokultur in der vorgestellten eigenen Studie übertragbar. Sie sind nur eine allgemeine Darstellung der möglichen Erklärungen, wie die erhöhte Biofilmresistenz zustande kommt. Dabei ist auffällig, dass einige Resistenztheorien miteinander in Zusammenhang stehen und nicht getrennt betrachtet werden sollten.

Eine im Verlauf von Experimenten beobachtete Zunahme der Resistenz von *S. sanguis*-Biofilmen stellt keine wirkliche Resistenz, sondern eine Selektion weniger sensibler Stämme (Gjerme 1989) bzw. eine Adaptation an Chlorhexidin dar (McDermid *et al.* 1987; Millward und Wilson 1989).

4.3 Weiterführende Gedanken

Im Hinblick auf die Verbesserung der Wirksamkeit antimikrobieller Substanzen auf Biofilme gibt es eine Reihe von Möglichkeiten, die bisher nicht oder nur gering erforscht sind.

Zu den besser untersuchten Möglichkeiten gehört die Unterstützung der Antiseptika durch elektrische (Costerton 1995; Gilbert *et al.* 1997; Costerton 1999; Schulz *et al.* 2000) und magnetische Felder (Qian *et al.* 1997; Williams und Pitt 1997) oder Ultraschall (Gilbert *et al.* 1997; Williams und Pitt 1997). Man spricht deshalb vom sog. bioelektrischen, biomagnetischen bzw. bioakustischen Effekt. Der bioelektrische Effekt beeinflusst die Ladung der Polymere der Matrix (Gilbert *et al.* 1997). Zur Erklärung nimmt man an, dass das Anlegen eines elektrischen Feldes eine schnellere Diffusion des Antiseptikums bewirkt (vergl. Elektrophorese), da die meisten Moleküle geladen und divalente Kationen entfernt werden (Khoury *et al.* 1992; Costerton *et al.* 1994; Costerton 1997; Qian *et al.* 1997). Es ließ sich darüber hinaus feststellen, dass Bakterien durch das Anlegen einer geringen Spannung permeabel für Substanzen werden, was bezüglich der Antiseptika ausgenutzt werden kann (Khoury *et al.* 1992).

Ähnliche Hypothesen existieren für den bioakustischen Effekt. Danach soll mehr antimikrobielle Substanz durch den Biofilm bzw. die Zellmembran geschleust werden. Der Transport hydrophober Moleküle wird erleichtert, und es werden Gene zur Expression induziert, die die Permeabilität verändern (Johnson *et al.* 1998).

Eine gewisse Ähnlichkeit zu den eben genannten Forschungsrichtungen hat die Entwicklung und Verwendung lichtaktivierbarer Substanzen (Wilson *et al.* 1996a). Es stellt sich jedoch die Frage, ob solche Methoden speziell in der Mundhöhle

anwendbar und praktikabel sind. In jedem Fall müsste die Anwendung durch den Zahnarzt vorgenommen werden.

Einfacher gestaltet sich die Verwendung von Enzymen. Johansen *et al.* (1997) weisen auf eine solche Methode hin. Sie berichten von Experimenten, in denen die Matrix durch Enzyme abgebaut wird. Dabei wurden die Enzyme Dextranase und Mutanase verwendet. Beide Enzyme haben in Kombination angewendet einen additiven, jedoch keinen bakterioziden Effekt.

Am naheliegendsten ist die Anwendung verschiedener Antiseptika in Kombinationen. Es kommt zu einem additiven Effekt, wenn die Substanzen verschiedene Wirkmechanismen haben (McDermid *et al.* 1985; Scheie 1989).

Generell muss die nächste Generation von Antiseptika auf der Basis von Biofilmodellen getestet und entwickelt werden. Hilfreich dafür ist ein besseres Verständnis von Vorgängen, die sich in Biofilmen abspielen (Marsh 1999). Dann ist es auch möglich, das von Liljemark *et al.* (1997) erwähnte kleine Wachstumsfenster der Verletzlichkeit von Biofilmen zu erkennen und zu nutzen.

Die Effektivität der entwickelten Substanzen kann letztlich in sog. „Phase-2/Step-2“ Tests ermittelt werden, in denen gesunde Probanden die Mittel unter standardisierten Bedingungen anwenden und die Ergebnisse nach einer genau definierten Studie gesammelt werden. Schließlich müssen klinische Tests über den Nutzen der Anwendung und über Nebenwirkungen der Antiseptika entscheiden.

Die bisherigen Gedanken zielen auf die Vernichtung eines existenten Biofilms ab. Neuere Forschungsrichtungen versuchen eine Ebene

höher, an der Biofilmentstehung, anzusetzen. Man hat einen Signalstoff gefunden, der die Bildung von Bakterienfilmen auslöst. Es handelt sich dabei um ein Derivat des Homoserinlactons (HSL). Eine *Pseudomonas aeruginosa*-Mutante, deren Gen für die Bildung des Botenstoffes zuvor zerstört worden war, konnte nach Zugabe von N-(3-oxododecanoyl)-L-Homoserinlacton wieder robuste, stark zusammenhängende Biofilme bilden. Ohne das HSL waren die Biofilme nur schwach zusammenhängend und leicht auflösbar. Beim HSL handelt es sich um bakterielle „Hormone“, die eine Kommunikation zwischen Zellen ermöglichen. Es wäre denkbar, die Biofilmbildung durch HSL-Analoga zu verhindern, indem der natürliche Signalstoff imitiert und von seinen Targets verdrängt wird ohne die Filmbildung auszulösen (Science 1998).