

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie, Endodontologie,
Präventive Zahnmedizin und Kinderzahnheilkunde
(Leiter: Univ.-Prof Dr. med. dent. Thomas Kocher)
im Zentrum für Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde
(Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Karl-Friedrich Krey)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Zur Wirksamkeit des Lactoperoxidase-Systems
in einem Mundpflegeprodukt**

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin
(Dr. med. dent.)
der
Universitätsmedizin
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2019

vorgelegt von:
Sebastian Patjek
geb. am: 17.07.1984
in: Dresden

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur

1. Gutachter: PD Dr. A. Welk

2. Gutachter: Prof. Dr. T. Auschill

Tag der Disputation: 15. November 2019

Für meine Familie

1	Einleitung	6
2	Speichelperoxidase-System	10
2.1	Peroxidase	10
2.2	Thiocyanat (SCN ⁻)	13
2.3	Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	16
2.4	Peroxidase-System	18
2.5	Weitere körpereigene antimikrobielle Proteine	23
2.6	Produkte auf LPO Basis	25
2.7	Zielsetzung	28
3	Material und Methoden	29
3.1	Versuchsdurchführung	29
3.1.1	Erhebung des Quigley & Hein Index	31
3.1.2	Gewinnung und Aufbereitung der Proben	31
3.2	Chemikalien	32
3.2.1	Rezepturen	32
3.3	Geräte	34
3.4	Mikrobiologische Untersuchungen	34
3.5	Ionenchromatographie	35
3.6	Statistische Auswertung	35
4	Ergebnisse	37
4.1	Plaquebildung	37
4.2	S. mutans	38
4.3	Lactobacillen	39
4.4	Gesamtkeimzahl	40
4.5	Chemische Analyse	41
5	Diskussion	52
5.1	Methodik	52
5.2	Ergebnisse	53
5.2.1	Plaquebildung	53
5.2.2	S. mutans	56
5.2.3	Lactobacillen	57
5.2.4	Gesamtkeimzahl	58
5.2.5	Chemische Analyse	59

6	Zusammenfassung	63
7	Literaturverzeichnis.....	65
8	Abbildungsverzeichnis	82
9	Formelverzeichnis.....	83
10	Tabellenverzeichnis	84
11	Danksagung.....	85

1 Einleitung

Die Etablierung eines ausgereiften Biofilms stellt die Grundlage oraler Krankheiten wie Karies, Gingivitis und Parodontitis dar. Schon nach kurzer Zeit bildet sich durch van-der-Waals-Kräfte eine dünne Pellikelschicht bestehend aus Muzinen, Glykoproteinen, Speichelproteinen und Lipiden auf der Zahnoberfläche (Hannig & Balz 1999, Lendenmann et al. 2000). Hierauf lagern sich erste Pionierkeime an. Bereits nach 24 Stunden besiedeln erste pathogene Keime den initialen Biofilm. Im Laufe der Zeit entwickelt sich der Biofilm zu einer komplexen organischen Matrix, in der es zu einem Shift vom kommensalem Microbiom hin zu einem pathogenen Zustand kommt. Dies gilt es durch regelmäßige mechanische Zerstörung und Entfernung des Biofilms zu verhindern. Allerdings sind nur wenige Menschen in der Lage, sich effektiv und gründlich die Zähne mechanisch zu reinigen (Attin & Hornecker 2005). Neben mangelnder Motivation und Defiziten in der Putztechnik kommen oft weitere erschwerende Faktoren zum Tragen, wie zum Beispiel Zahnengstände oder festsitzende Zahnspangen.

Die Untersuchung der oralen Plaque brachte in den letzten Jahren eine Vielzahl an neuen Erkenntnissen (Marsh 2005). In der Vergangenheit ging man davon aus, dass allein die Quantität der Plaque zu oralen Krankheiten führt (Flemmig & Beikler 2011). Mit dem steigenden Wissen um die Komplexität der Plaque etablierte sich der Begriff des oralen Biofilms. So wird nicht mehr die Quantität als treibende Kraft für orale Krankheiten angesehen, sondern die Etablierung pathogener Mikroorganismen (Takahashi & Nyvad 2008, Flemmig & Beikler 2011). Aufbauend auf die erweiterte ökologische Plaquehypothese können diese pathogenen Bakterien in geringer Menge auch schon Teil des nicht pathogenen Biofilms sein. Unter physiologischen Bedingungen sind diese aber nur schwach kompetitiv (Kneist & Callaway 2013). Der Biofilm stellt eine Infrastruktur für Nahrung und Schutz dar. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Bakterien in einem Biofilm eine geringere Sensibilität gegenüber antimikrobiellen Substanzen haben (Gilbert et al. 1997, Ceri et al. 1999, Stewart et al. 2001, Gilbert et al. 2002). Aufbauend auf diesem Wissen wurden die in der Mikrobiologie verwendeten Begriffe der minimalen Hemmkonzentration und der minimalen bakterioziden Konzentration um den Begriff der Biofilm

Hemmkonzentration (biofilm inhibitory concentration, BIC) erweitert. In der Literatur finden sich auch synonym verwendete Begriffe wie 'biofilm eradicating concentration' oder 'biofilm killing concentration' (Anwar & Costerton 1990, Nichols 1994, Johnson et al. 2002). Neben der Matrix-Architektur ist auch die Fähigkeit, Enzyme wie beispielsweise β -Lactamase zu binden, eine wichtige Eigenschaft des Biofilms (Allison 2003). In einem ohnehin von außen schwer regulierbarem Habitat wie der Mundhöhle sollte angesichts der Komplexität von Abwehrmaßnahmen seitens der Mikroorganismen ein Umdenken hinsichtlich antibakterieller Maßnahmen einsetzen. Längst ist bekannt, dass viele Bakterien der Mundgesundheit zuträglich sind (Marsh 2012). Selbstverständlich reagiert das Immunsystem auch auf diese Bakterien, aber es existieren Mechanismen, welche eine vorteilhafte Partnerschaft ermöglichen (Srinivasan 2010). So gibt es Hinweise, dass eine aktive Kommunikation ('cross talk') zwischen ansässigen Bakterien und den Mucosazellen existiert, so dass das Immunsystem nur bei einer Störung des bakteriellen Gleichgewichts reagiert (Cosseau et al. 2008, Srinivasan 2010). Die angestammten Bakterien bewirken eine so genannte 'colonisation resistance', welche die Etablierung schädlicher Mikroorganismen verhindert, indem sich eine langzeitstabile 'microbial homeostasis' ausbildet (Marsh 1989). Synonym werden auch andere Begriffe wie beispielsweise 'human microbiom' oder 'resident biota' hierfür verwendet. Dieses Gleichgewicht ergibt sich aus hoch dynamischen Prozessen, das zeigt sich beispielsweise bei der Änderung von Faktoren wie Speichelfluss oder Ernährung. Diese Veränderungen führen zu einer Verschiebung des Gleichgewichts von einer physiologischen zu einer pathologischen Zusammensetzung. Bakterienstämme, welche zuvor in einer Minderheit vertreten waren, werden zur dominanten Art und damit ändert sich auch das metabolische Verhalten des Biofilms (Marsh 2003). Dass Karies aus einer säurebedingten Demineralisierung der Zahnhartsubstanz resultiert, hervorgerufen durch den Stoffwechsel von *S. mutans* und sogenannten Nicht-Mutans-Streptococccen, ist seit Jahren unbestritten (Marsh 2005, Takahashi & Nyvad 2008, Kneist & Callaway 2013). Die ökologische bzw. die erweiterte ökologische Plaquehypothese stellt den aktuellen Erkenntnisstand dar. Grundsätzlich wird hierbei davon ausgegangen, dass innerhalb der Plaque eine physiologische 'Mischkultur' besteht. Die dominierenden Bakterien werden auch als 'Generalisten' bezeichnet. In dieser 'Mischkultur' können aber auch potentiell pathologische Bakterien bereits

vorhanden sein. Sie sind allerdings bei neutralem pH-Wert nur schwach kompetitiv. Bei einer erhöhten Verfügbarkeit an fermentierbaren Kohlenhydraten und persistierenden Intervallen mit niedrigen pH-Werten erlangen die als 'Spezialisten' bezeichneten, azidogenen bzw. azidurischen Bakterien einen Selektionsvorteil, was mit einer gesteigerten Proliferation einhergeht (Kneist & Callaway 2013). Neben den Mutans-Streptococccen können auch andere Streptococccenarten (*S. gordonii*, *S. oralis* und *S. mitis*), die Teil des physiologischen Biofilms sind und anfänglich eine geringe Säureproduktion haben, bei niedrigem pH-Wert zu aggressiven, stark säurebildenden Stämmen werden (Sansone et al. 1993, Alam et al. 2000, Aas et al. 2008). Bleibt diese pathologische Bakterienzusammensetzung bestehen, führt das zu Karies (Marsh 2003, Takahashi & Nyvad 2008). Marsh (2012) empfiehlt deshalb, neben einer regelmäßigen mechanischen Plaqueentfernung, die zu dieser Verschiebung führenden Faktoren zu identifizieren und diesen entgegenzusteuern. Eine adäquate Strategie wäre, das Gleichgewicht in Zeiten von veränderten Umweltbedingungen (Nahrungszufuhr oder verminderter Speichelfluss) zu stärken. Neben der gewohnten mechanischen Reinigung sollte es daher das Ziel sein, den Biofilm derart zu beeinflussen, dass apathogene Bakterien einen Selektionsvorteil haben und sie sich auf diese Weise zur dominierenden Art entwickeln bzw. ihren Status bewahren können. Diese Einflussnahme sollte weniger einen Eingriff als vielmehr ein Biofilm-Management darstellen. Durch die selektive Einflussnahme ist auch ein bedenkenloser Langzeitgebrauch möglich. Die Anwendung sollte außerdem einfach in den Alltag integrierbar sein.

Die Mundhöhle besitzt diverse Mechanismen um ein natürliches Gleichgewicht zu gewährleisten. Unter all diesen Systemen scheint das Speichelperoxidase-System, zu dem die Speichelperoxidase (SPO), Thiozyanat (SCN^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie deren Reaktionsprodukt Hypothiocyanit (OSCN^-) gezählt werden, ein potentes System zu sein (Thomas et al. 1994, Welk et al. 2011). Das Bestreben dieses System zu verstehen und es für die kommerzielle Anwendung nutzbar zu machen, belegen diverse Studien und Reviews (Tenovuo 2002, Ashby 2008, Ashby 2012, Flemmig et al. 2016, Mahdi et al. 2017, Singh et al. 2017).

In der Literatur wird LPO (Lactoperoxidase) oft als Synonym für SPO genutzt (Flemmig et al. 2016). Dies geht auf die Entdeckung des Enzyms in Kuhmilch im

Jahr 1943 durch Theorell und Akenson zurück (Theorell & Akenson 1943). Spätere Untersuchungen ergaben eine hohe Ähnlichkeit zwischen dem bovinen und dem humanen Peroxidase-Enzym (Mansson-Rahemtulla et al. 1988, Mansson-Rahemtulla et al. 1990, Sharma et al. 2013, Flemmig et al. 2016). Aufgrund der wesentlich einfacheren Gewinnung wird sowohl für klinische Studien als auch für kommerzielle Anwendungen die bovine LPO genutzt.

Im Kapitel 2 wird näher auf das Speichelperoxidase-System und seine Bestandteile eingegangen, abschließend folgt ein Überblick über die Studienlage der bisherigen kommerziellen Anwendungen.

2 Speichelperoxidase-System

Der menschliche Speichel übernimmt eine Vielzahl von Funktionen, neben der Befeuchtung der Mundhöhle oder auch der Stabilisierung des pH-Wertes, dient er vor allem als Schutz- und Abwehrsystem (Hellwig et al. 2013). Bei *in vitro* Versuchen wurde nachgewiesen, dass diverse Proteine (Lysozym, Lactoferrin und Peroxidasen) eine antimikrobielle Aktivität gegenüber einer Vielzahl von Bakterien, Viren und Pilzen aufweisen. In der Gruppe der unspezifischen Abwehr nimmt das Speichelperoxidase-System eine besondere Stellung ein, indem es das orale Mikrobiom reguliert (Pruitt et al. 1984, Furtmuller et al. 2002, Tenovuo 2002, Ihalin et al. 2006). Damit aber eine derartige Regulation realisiert werden kann, benötigt die Peroxidase Reaktionspartner. Wasserstoffperoxid wird durch diverse Stoffwechselprozesse von Bakterien, aber auch vom körpereigenen Abwehrsystem produziert (Carlsson et al. 1983, Pruitt et al. 1983). Da H_2O_2 nicht nur Bakterienzellen, sondern auch humane Zellen schädigt, sollte es mittels einer Peroxidase abgebaut werden. Dafür benötigt dieses Enzym noch einen Akzeptor für das Sauerstoffatom. Gute Reaktionspartner sind Thiocyanat und Iod. Beide Stoffe werden aktiv aus dem Blut per Natrium-Iodid-Symporter (NIS) transportiert (Fragoso et al. 2004) und in Epithelzellen angereichert. Was dazu führt, dass 10- bis 20-fach höhere Konzentrationen in Sekreten ermittelt werden konnten als im Plasma. Aufgrund der Konzentrationen ist Thiocyanat der Hauptreaktionspartner und die Reaktion mit Iod eher zu vernachlässigen. Im Plasma werden Iod Werte unterhalb von 100 nMol, respektive 5 - 22 μ Mol im Speichel erreicht. Im Gegensatz dazu konnten Thiocyanat Werte von bis zu 4000 μ Mol ermittelt werden (Tenovuo & Makinen 1976). Im Folgenden wird auf die einzelnen Bestandteile dieses Systems detaillierter eingegangen.

2.1 Peroxidase

Wenn in der Literatur von einer Peroxidase, die unspezifische Abwehrleistung des Immunsystems vermittelt die Rede ist, wird diese oftmals nur als Lactoperoxidase

(LPO) bezeichnet (Flemmig et al. 2016), da sie wie bereits erwähnt, erstmals 1943 aus Kuhmilch isoliert wurde (Theorell & Akeson 1943). Nachdem die erste Peroxidase aus humanem Speichel isoliert wurde, zeigte sich eine sehr hohe Ähnlichkeit hinsichtlich Struktur, chemischen und immunologischen Eigenschaften zur bovinen Peroxidase, daher die synonyme Verwendung (Mansson-Rahemtulla et al. 1988, Mansson-Rahemtulla et al. 1990, Davies et al. 2008, Sharma et al. 2013, Flemmig et al. 2016). Sehr ähnliche Variationen dieses Hämproteins konnten später auch in anderen Sekreten isoliert werden, wie zum Beispiel in Sekreten der menschlichen Brust-, Speichel-, Tränendrüsen und sekretorischen Drüsen der oberen Atemwege (Davies et al. 2008).

Im menschlichem Speichel sind derzeit drei Peroxidasen bekannt, die humane Speichelperoxidase (hSPO), die humane Myeloperoxidase (hMPO) und die humane eosinophile Peroxidase (hEPO) (van Dalen & Kettle 2001, Ihalin et al. 2006, Arnhold & Flemmig 2010). Es sind für die verschiedenen Peroxidasen jeweilige pH-Wert abhängige Wirkungsoptima dokumentiert. Bei neutralem pH-Wert ist die hSPO aktiver, bei sinkendem pH-Wert steigt der Umsatz der hMPO (Paetzelt et al. 1984). Der hMPO ist es auch möglich Cl^- (Morrison & Schonbaum 1976, Arnhold et al. 2006) oder Br^- in der Mundhöhle in kleinen Mengen zu oxidieren, der hSPO fehlt diese Möglichkeit (Thomas et al. 1995).

Die humane Speichelperoxidase wird vornehmlich in der Glandula Parotis synthetisiert und sezerniert (Nagler et al. 2002). Die hMPO und die hEPO können ebenfalls im Speichel nachgewiesen werden, allerdings stammen sie aus den neutrophilen bzw. eosinophilen Granulozyten des Speichels und gelangen über den gingivalen Sulcus in die Mundhöhle (Clifford & Repine 1982, Tenovuo & Pruitt 1984, van Dalen & Kettle 2001, Arnhold & Flemmig 2010). Hinsichtlich der Gesamtmenge an hEPO kann aufgrund fehlender Daten keine Aussage getroffen werden. Bei der hSPO und der hMPO ist die Datenlage weitaus besser. Allerdings verweisen Thomas et al. (1994) darauf, dass der festgestellte Wert von hSPO und hMPO stark von der Untersuchungsmethode und der Probengewinnung abhängt (siehe Tabelle 1). Wobei laut dieser Veröffentlichung der größere Anteil der Peroxidasen in der Mundhöhle oftmals durch die in den neutrophilen Granulozyten produzierte hMPO gestellt wird. So berichten Thomas et al. (1994), dass der Anteil der hMPO zweimal höher sei, als

die Menge an hSPO. Aufgrund der Herkunft der hMPO steht die Menge in direktem Zusammenhang mit dem Entzündungsgrad der Gingiva (Ozmeric 2004). Aus diesem Grund wurde sie auch schon als Entzündungsmarker zur Beurteilung der Mundschleimhaut herangezogen (Suomalainen et al. 1996). Bei allen anderen Untersuchungen war die hSPO die dominante Peroxidase (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1, Konzentrationsangaben von hMPO und hSPO im Speichel

hMPO in µg/ml	hSPO in µg/ml	Referenz
3,6 ± 2,1	1,9 ± 1,0	(Thomas et al. 1994)
0,24 ± 0,19*	0,34 ± 0,09*	(Vilja et al. 1991)
0,6 ± 0,5*	1,7 ± 0,7*	(Thomas et al. 1994)
1,0 ± 2,0	2,6 ± 1,6	(Mansson-Rahemtulla et al. 1992)
1,6 - 5,2	3 - 12	(Rudney et al. 1991)

Die unterschiedlichen Messwerte ergeben sich aus verschiedenen Methoden der Probengewinnung und der Probenanalyse. *Diese Werte wurden aus dem Überstand der Probe ermittelt (Thomas et al. 1994).

Peroxidasen besitzen außerdem die Fähigkeit eine irreversible Bindung zum Zahnschmelz aufzubauen, allerdings wurde bei *in vitro* Studien ein Rückgang der Enzymaktivität auf 75 % der ursprünglichen Umsatzleistung beobachtet (Pruitt & Adamson 1977, Tenovuo et al. 1977). 1979 zeigten Pruitt et al., dass trotz des Rückgangs der LPO-Aktivität nach der Bindung noch ausreichend Enzymaktivität vorhanden ist, um die Säureproduktion von *S. mutans* zu hemmen. Diese Leistung nimmt aber im zeitlichen Verlauf ab (Pruitt et al. 1979).

Eine Bindung an die Bakterienoberfläche verringert die Mobilität der Bakterien und ihre Fähigkeit sich zu verbinden, bzw. einen Biofilm zu etablieren, indem die LPO unter anderem die Glucosyltransferase inhibiert (Korpela et al. 2002). Die Autoren vermuten, dass eine Bindung der Lactoperoxidase an die membranständige

Glycosyltransferase zu einer Änderung in deren Proteinstruktur und somit zu einer Aktivitätsänderung führt.

2.2 Thiocyanat (SCN^-)

Thiocyanat ist ein kleines Anion das zu den Pseudohalogeniden zählt (Morgan et al. 1965). Die Bezeichnung Pseudohalogen spiegelt das chemische Verhalten von SCN^- wider, da es in seiner Reaktivität den Halogenen sehr ähnelt. Der Mensch nimmt SCN^- vor allem über die Nahrung auf, so ist es nahe liegend, dass sich je nach Ethnie und Ernährungsgewohnheit starke Differenzen in den ermittelten Werten feststellen lassen. Ist die Ernährung beispielsweise stark beeinflusst von Maniok, Süßkartoffel, Mais, Zuckerrohr, Sorgum und Leinsamen, resultiert ein hoher SCN^- Gehalt im Plasma daraus (Han & Kwon 2009, Leung et al. 2011). Cyanogene und thiocyanogene Pflanzen wie Brassica sind eine wichtige SCN^- Quelle. Thiocyanat entsteht außerdem im Körper im Zuge der Entgiftung von Cyanid durch das Enzym Rhodanese, einer Schwefeltransferase die u. a. in der Leber vorhanden ist (Nagahara et al. 1995). Das Vorhandensein anderer endogener Quellen ist durchaus denkbar. Das reichliche Vorkommen in biologischen Systemen und die Fähigkeit einer zügigen Konzentrationserhöhung in extrazellulären Sekreten (Gould et al. 2010) legt diese Vermutung nahe. Gould et al. (2010) zeigten, dass Epithelzellen der Lunge messbare Level an SCN^- generieren, wenn sie in einem Medium frei von detektierbaren SCN^- angezüchtet wurden. Wissing (1974) konnte nachweisen, dass einige Bakterien (u. a. *Pseudomonas aeruginosa*) Cyanid aus Glycin generieren konnten. Es ist allerdings unklar ob eukaryotische Zellen ähnliche Fähigkeiten besitzen.

SCN^- kann in Granulozyten und Monozyten nachgewiesen werden. Bei Säugetieren kommt es in einer Vielzahl von extrazellulären Flüssigkeiten vor, wie zum Beispiel in Plasma, Speichel, Milch, Tränenflüssigkeit, Verdauungsflüssigkeit, als auch im Sekret von Epithelialzellen der Nase und des Atemweges (van Haeringen et al. 1979, Thomas 1981, Tenovuo & Pruitt 1984, Thomas 1985, Das et al. 1995, Fragoso et al. 2004). Die jeweils festgestellten Mengen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2, Zusammenstellung der ermittelten SCN⁻ Werte

Quelle	SCN ⁻ (µMol)	Referenz
Speichel	500 - 4000	(Schultz et al. 1996) (Tenovuo & Makinen 1976) (Minarowski et al. 2008) (van Haeringen et al. 1979)
Nasensekret	100 - 1200	(Lorentzen et al. 2011) (Fischer et al. 2011)
Atemwegssekret	30 - 650	(Thomson et al. 2010) (Wijkstrom-Frei et al. 2003)
Verdauungsflüssigkeit	250 - 300	(Das et al. 1995)
Tränenflüssigkeit	150	(van Haeringen et al. 1979)
Plasma	5 - 50	(Vesey & Cole 1985) (Lorentzen et al. 2011)
Milch	0,1 - 4	(Kirk et al. 2007) (Wokes et al. 1952)

Die große Streuung der erreichten Werte könnte auch mit den jeweiligen Messverfahren zusammenhängen. Chandler & Day (2012) gaben zu bedenken, dass eine Oxidation oder das Eingehen einer kovalenten Bindung das Ergebnis der SCN⁻ Werte beeinflussen kann, wenn nicht Maßnahmen ergriffen werden, um eine Reaktion zu verhindern. Die Autoren vermuteten, dass die Differenz zwischen den gefundenen Plasma- und Atemwegswerten durch einen aktiven Transport über entsprechende Transportkanäle für SCN⁻ aus dem Plasma zustande kommt. Die Ausscheidung erfolgt über die Nieren mit einer Halbwertszeit von 3 Tagen bei gesunden Individuen. In Relation zur glomerulären Filtrationsrate entspricht das einer Rückgewinnung von 90 % (Schulz 1984, Vesey & Cole 1985).

Es ist auffällig, dass sich hohe Konzentrationen vor allem an Körpereintrittspforten nachweisen lassen (van Haeringen et al. 1979, Schultz et al. 1996, Minarowski et al. 2008, Lorentzen et al. 2011). So weist der Speichel bzw. die Mundhöhle höhere

SCN⁻ Werte als die Atemwege auf. Dies ist allerdings nicht verwunderlich, da die Mundhöhle aufgrund ihrer Funktion und Lokalisation eine komplexe und potente antibakterielle Verteidigung benötigt (Ashby 2008). Tenovuo & Makinen (1976) verstanden die Funktion als oxidierbarer Co-Faktor im Peroxidase-System als einzigen Grund für das Vorkommen von SCN⁻ im menschlichem Speichel. Kramer et al. (1998) sahen das Ion als allgegenwärtiges Vitaminoid mit einer Vielzahl an Funktionen. Die SCN⁻ Werte von 500 - 4000 µM im Speichel (Tenovuo & Makinen 1976, van Haeringen et al. 1979, Schultz et al. 1996) werden dabei durch die gleichen zellulären aktiven Transportmechanismen wie in den Atemwegen generiert (Fragoso et al. 2004). Ashby (2008) und Schultz et al. (1996) sehen in dieser hohen Konzentration eine Bestätigung der Wichtigkeit des LPO Systems. Stellt doch das Vorhandensein von SCN⁻ eine essentielle Grundlage für dieses System dar.

Was eine Störung des transmembranalen Transportes von SCN⁻ bewirkt, zeigt sich bei der zystischen Fibrose, einer Krankheit die von wiederkehrenden Infektionen der Lunge und anderen Organen geprägt ist (Xu et al. 2009). Die Anwesenheit von SCN⁻ hat weitere positive Einflüsse auf die Abwehrleistung, so resultierte aus einer länger andauernden Präsenz von SCN⁻ eine erhöhte Phagozytoseleistung von Granulozyten und Monozyten (Jahr et al. 1986), sowie eine Steigerung der Phagozytenmotilität (Schmidt & Morenz 1985) und der Phagozytenproliferation (Weuffen et al. 1990).

Aber auch eine exogene Beeinflussung des SCN⁻ Spiegels ist beispielsweise durch toxische und mutagene Faktoren möglich. So findet sich bei Rauchern ein etwa doppelt so hoher SCN⁻ Gehalt im Speichel verglichen mit Nichtrauchern, was sich mit der Entgiftung von mit dem Rauch aufgenommenen Cyanid erklären lässt (Tenovuo & Makinen 1976, Yamanaka et al. 1991, Holiday et al. 1995, Scanlon et al. 1996). Allerdings geben Tenovuo & Makinen (1976) auch die Möglichkeit an, dass eine Steigerung der Werte über eine Steigerung des Speichelflusses zustande kommt. Bei sehr starken Rauchern wurden Werte von bis zu 4 mMol ermittelt, wohingegen sich der Wert beim Nichtraucher bei 0,5 - 2 mMol einordnen lässt (Tenovuo & Makinen 1976). Es konnte ebenfalls ein Anstieg bei Stresssituationen beobachtet werden (Goi et al. 2007).

2.3 Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

Das im Speichel befindliche H₂O₂ ist das Ergebnis verschiedener Stoffwechselprozesse, welche von Bakterien und vom Wirt selbst durchgeführt werden (Carlsson 1987). Wobei die Gesamtmenge auf 8 - 13 µMol geschätzt wird (Pruitt et al. 1986). Bisher konnte kein H₂O₂ in der Mundhöhle detektiert werden (Pruitt et al. 1986, Ihalin et al. 2001). Das kann an der hohen Reaktivität oder an diversen H₂O₂-umwandelnden Systemen liegen (Pruitt 1987, Ashby 2008). Ein Teil des H₂O₂ stammt aus Leukozyten oder anderen Wirtszellen (Pruitt et al. 1983), welche die Mundhöhle über den Sulcus gingivae und den Tonsillen erreichen (Pruitt et al. 1984, Ozmeric 2004). Wobei davon ausgegangen wird, dass die polymorphkernigen Leukozyten die vorherrschenden phagozytischen Zellen im Speichel sind (Ozmeric 2004). Vidovic et al. (2012) konnten bei gesunden Individuen eine hohe Tagesvariabilität hinsichtlich des Gehaltes an polymorphkernigen Leukozyten feststellen. Dies macht es unmöglich, verlässliche Aussagen über den Gehalt an Leukozyten bzw. die Gesamtmenge an von Abwehrzellen produziertem H₂O₂ zu treffen.

Pruitt et al. (1983) vermuteten eine endogene H₂O₂ Quelle, da sie OSCN⁻ im Ausführungsgang der Glandula Parotis detektieren konnten. Sie schlussfolgerten dies aus der Annahme, dass eine gesunde Speicheldrüse keinerlei Ansammlungen von Bakterien und Leukozyten aufweist und kein OSCN⁻ ohne H₂O₂ gebildet werden kann. Laut Geiszt et al. (2003) können die Speicheldrüsen mit einem aktiven dual oxidase 2 Gen (Duox2) eine konstante Menge an H₂O₂ produzieren. Die Autoren gehen davon aus, dass die Beimengung von reaktiven Sauerstoff Metaboliten der letzte Schritt der Speichelproduktion ist, bevor der Speichel in die Mundhöhle sezerniert wird (Geiszt et al. 2003, Leto & Geiszt 2006).

Wie komplex der Einfluss von H₂O₂ auf das Microbiom ist, zeigten Redanz et al. (2018) in ihrem Review. So sind diverse Mikroorganismen in der Lage H₂O₂ zu bilden. Unter den fakultativ anaeroben Bakterienspezies sind ca. 60 % H₂O₂-bildend (Kraus et al. 1957), wobei die Gattungen der Streptococcen und Lactobacillen am stärksten vertreten sind (Tenovuo & Anttonen 1980, Thomas et al. 1981, Carlsson et

al. 1983, Thomas et al. 1983). Garcia-Mendoza et al. (1993) zeigten bei *in vitro* Untersuchungen, dass *S. oralis*, *S. mitis*, *S. sanguinis* und *S. sobrinus* in der Lage sind, eine signifikante Menge an H_2O_2 zu produzieren. Diese oralen Streptococci können häufig in relativ hoher Anzahl im oralen Biofilm nachgewiesen werden (Lucas et al. 2000). Interessanterweise konnten Geiszt et al. (2003) einen Unterschied in der H_2O_2 Produktion in Abhängigkeit von dem Nährmedium und den zur Verfügung stehenden Kohlenhydraten feststellen. Dies deutet darauf hin, dass eine regulative Beeinflussung der Produktion durch Umwelteinflüsse möglich ist. Zheng et al. (2011) zeigten zum ersten Mal am Beispiel von *S. gordonii* den Einfluss von Umwelteinflüssen auf die H_2O_2 Produktion. Sie konzentrierten sich dabei auf ein spezielles Gen (*spxB*), welches die Pyruvat Oxidase kodiert und die Bakterien befähigt H_2O_2 zu produzieren. Die Autoren konnten einen direkten Zusammenhang zwischen Umwelteinflüssen und Genexpression aufzeigen. Neben der Pyruvat Oxidase sind derzeit zwei weitere Enzyme bekannt, welche es den Streptococci ermöglicht, wachstumsinhibierende Mengen an H_2O_2 zu produzieren (Carlsson & Edlund 1987, Carlsson et al. 1987, Tong et al. 2007, Kreth et al. 2008, Liu et al. 2012).

2.4 Peroxidase-System

Das Speichelperoxidase-System setzt sich aus den drei zuvor vorgestellten Komponenten (Peroxidase, Thiocyanat und Wasserstoffperoxid) zusammen. Die Abbildung 1 aus Tenovuo & Pruitt (1984) fasst noch einmal die Herkunft dieser drei Reaktionspartner zusammen.

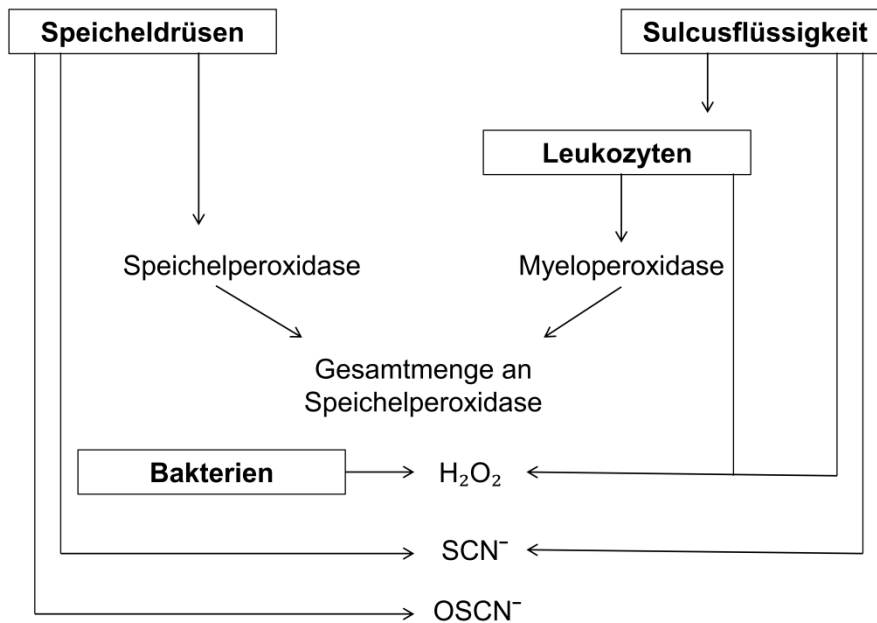
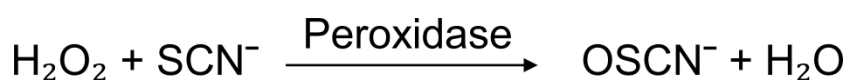


Abbildung 1, Bestandteile des Speichelperoxidase-Systems, aus Tenovuo & Pruitt (1984).

Das Wirkungsprinzip des Speichelperoxidase-Systems beruht auf der Oxidation von SCN^- durch H_2O_2 in Anwesenheit von einer Peroxidase bei neutralem pH-Wert (Flemmig et al. 2016). In der Mundhöhle wird die Reaktion durch die hSPO, die hMPO und die hEPO sowie durch die in Mundhygiene-Pflegeprodukten zugesetzte LPO katalysiert. Mit Hilfe dieser Enzyme wird unter Reduzierung von H_2O_2 Thiocyanat (SCN^-) zu Hypothiocyanit (OSCN^-) oxidiert (Thomas et al. 1980, Thomas et al. 1981), welches als Hauptprodukt dieser Reaktion angesehen wird (siehe Formel 1) (Aune et al. 1977, Dua et al. 2006).



Formel 1, Peroxidase katalysierte Bildung von Hypothiocyanit.

Man unterscheidet bei der Lactoperoxidase verschiedene Enzymzustände. Für die Oxidation von SCN^- sind 2 Enzymzustände von wesentlicher Bedeutung (siehe Abbildung 2), die entsprechenden Enzymaktivitäten werden als Halogenierungszyklus (Zwei-Elektronen Oxidation) und Peroxidasezyklus (Ein-Elektron Oxidation) bezeichnet. Der Peroxidasezyklus ist die Rückreaktion über den Komplex 2 zum nativen Enzym. Beim Halogenierungszyklus wird das native Enzym mittels H_2O_2 zu Komplex 1 oxidiert. Der oxidierte Komplex 1 kann dann mit SCN^- bzw. mit I^- reagieren (siehe Abbildung 2, Reaktion 1 und 2). Die in den Zellen des Immunsystems vorkommende MPO kann zusätzlich noch Cl^- und Br^- oxidieren. Beim Peroxidasezyklus (Reaktion 1, 3 und 4) ist die Anzahl der potentiellen Reaktionspartner um ein vielfaches größer (Schlorke et al. 2016).

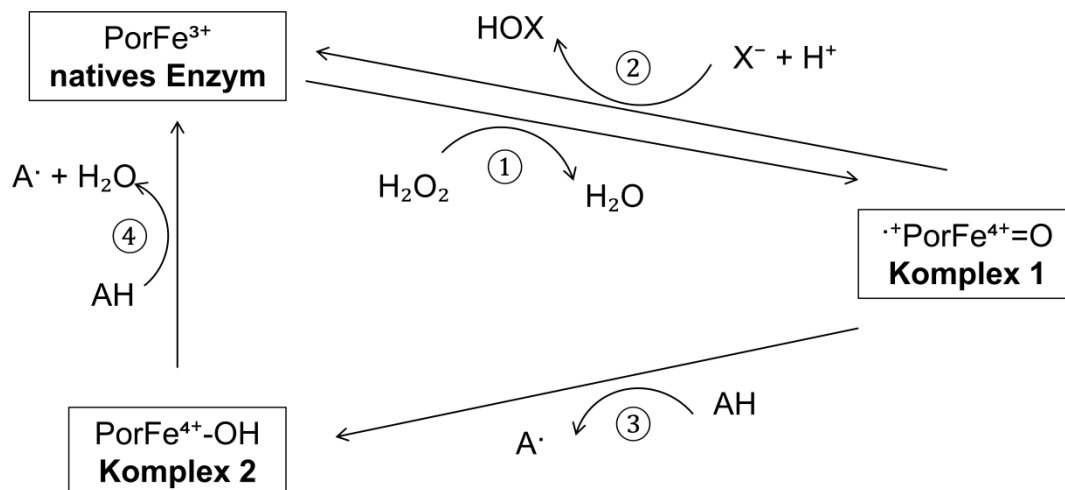


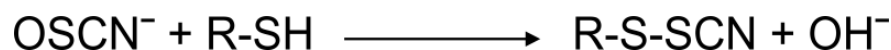
Abbildung 2, Enzymatische Aktivität der Lactoperoxidase, aus Schlorke et al.(2016). X = Halogen bzw. Pseudohalogen, A· = Radikal.

Das bei dieser Reaktion entstehende OSCN^- steht dabei im Gleichgewicht mit seiner protonierten Form HOSCN . Der pKs Wert wurde bisher mit 5,3 angegeben (Thomas 1981). Nagy (2009) veröffentlichte einen leicht niedrigeren Wert von 4,85.

OSCN^- stellt einen natürlichen Bestandteil des menschlichen Speichels dar (Thomas et al. 1980, Tenovuo et al. 1982, Pruitt et al. 1983). Die Menge variiert im unstimulierten Speichel von 10 bis 250 μMol , der Mittelwert beträgt 60 μMol (Thomas et al. 1980, Tenovuo et al. 1981, Pruitt et al. 1982, Tenovuo et al. 1982). Eine

Stimulierung des Speichels geht mit einem sofortigen Abfall des OSCN^- Wertes einher (Tenovuo et al. 1982). Dieser Effekt ist vermutlich auf die Verdünnung zurückzuführen.

Die antimikrobielle Wirkung von $\text{OSCN}^-/\text{HOSCN}$ beruht unter anderem auf dessen Fähigkeit, die essentiellen Sulfhydrylgruppen (R-SH) in mikrobiellen Enzymen zu Sulfenylthiocyanatverbindungen (R-S-SCN) zu oxidieren (Thomas & Aune 1978, Thomas 1981) (siehe Formel 2).

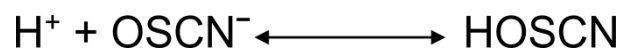


Formel 2, Oxidation essentieller Thiol-Gruppen unter Bildung von Sulfenylthiocyanat Verbindungen durch Hypothiocyanit.

Auf diesem Weg werden die Sulfidbrückenbindungen zerstört und können ihre Aufgabe, Stabilisierung der Tertiärstruktur von Proteinen, nicht mehr erfüllen. Skaff et al. (2009, 2012) vermuteten, dass nicht nur freie und proteingebundene Thiol-Verbindungen in Aminosäuren angegriffen werden, sondern auch die entsprechenden Selen-Verbindungen.

Die ungeladene Form HOSCN kann aufgrund der fehlenden Ladung die Bakterienzellwand wesentlich einfacher überwinden (Thomas 1981). Intrazellulär erfolgt dann auf dem beschriebenen Weg eine Hemmung der Glycolyse (Adamson & Pruitt 1981, Kersten et al. 1981, Carlsson 1983, Hawkins 2009, Barrett & Hawkins 2012) und der Glucosyltransferase (Korpela et al. 2002). Andere Autoren wie zum Beispiel Thomas et al. (1981) sehen das Wirkungsspektrum von OSCN^- aufgrund dessen anionischen Charakters auf die Außenseite der Bakterienzellwand beschränkt (Thomas & Aune 1978). So wurde nachgewiesen, dass OSCN^- die Glucoseaufnahme (Germaine & Tellefson 1981), den Glucosetransport (Mickelson 1977), die Sauerstoffaufnahme (Carlsson et al. 1983), die Atmungskette (Thomas & Aune 1978), die Wasserstoffbildung (Carlsson et al. 1983, Tenovuo & Pruitt 1984) sowie die Säureproduktion (Tenovuo et al. 1981) bestimmter Bakterien, z.B. von Streptococccen, hemmt.

Wenn es durch die Nahrungsaufnahme zu einem Absinken des pH-Wertes kommt, wird das Säure-Base-Gleichgewicht zugunsten der Säure verschoben (siehe Formel 3). Unter diesen Bedingungen stellt HOSCN das Hauptprodukt der Reaktion dar, das in einem Säure-Base-Gleichgewicht mit OSCN^- steht (pKs 5,3 bzw. 4,85) (Thomas et al. 1981, Nagy et al. 2009). So konnten Kersten et al. (1981) und Thomas et al. (1983) eine stärkere antibakterielle Wirkung des Speichelperoxidase-Systems bei niedrigem pH-Wert nachweisen, was sich auf den höheren Anteil an HOSCN zurückführen lässt.



Formel 3, Säure-Base-Gleichgewicht zwischen Hypothiocyant und Hypothiocyansäure.

Man geht davon aus, dass auch höher oxidierte Stufen (O_2SCN , O_3SCN) (Hogg & Jago 1970) gebildet werden und mit steigender Anzahl an Sauerstoffatomen eine Steigerung der antibakteriellen Wirkung einher geht (Pruitt et al. 1982). Diese Vermutung wird durch den Fakt gestützt, dass nichtenzymatisch gebildetes OSCN^- in gleicher Konzentration weniger antibakteriell ist, als enzymatisch gebildetes OSCN^- (Tenovuo et al. 1981). Da die höher oxidierten Produkte weitaus reaktiver sind als die einfach oxidierte Form, sind sie auch wesentlich instabiler (Tenovuo et al. 1981). Daher war es noch nicht möglich, diese höher oxidierten Stufen nachzuweisen. Es wird vermutet, dass ein Überschuss an H_2O_2 zu einer vermehrten Produktion an höher oxidierten Reaktionsprodukten führt (O_2SCN , O_3SCN) (Carlsson et al. 1984). Hierzu sollte allerdings angemerkt werden, dass Peroxidasen durch ihr eigenes Substrat irreversibel gehemmt werden können (Jenzer et al. 1986, Jenzer & Kohler 1986, Baynton et al. 1994).

Der pH-Wert der Mundhöhle unterliegt durch die Nahrungsaufnahme regelmäßigen Schwankungen, an die auch der Metabolismus von Bakterien geknüpft ist. So geht man davon aus, dass bei Nahrungszufuhr, vor allem von Kohlenhydraten und Zucker, die zuvor relativ inaktiven Bakterien metabolisch aktiv werden. Dies betrifft sowohl die obligat als auch die fakultativen anaeroben Bakterien, wie zum Beispiel Streptococccen. Die Verstoffwechslung von Glycoproteinen, Mono- und Disacchariden befähigt diese Organismen zur Bildung von H_2O_2 (Thomas et al.

1981). Dabei stellt das H_2O_2 nicht nur ein Stoffwechselendprodukt dar, es bietet dem Bakterium auch eine Menge Vorteile. Die Produktion von H_2O_2 ist eng mit der Freisetzung von DNA verbunden. Die extrazelluläre DNA ist entscheidend bei der Biofilmentwicklung und deren Stabilisation. Darüber hinaus dient sie dem horizontalen Gentransfer zwischen den oralen Streptococccen (Zhu & Kreth 2012). Außerdem verschafft die H_2O_2 Produktion, aufgrund der wachstumsinhibierenden Wirkung, einen Vorteil gegenüber anderen Bakterien, welche weniger tolerant gegenüber H_2O_2 sind (Zhu & Kreth 2012). Die Speichelperoxidasen wandeln H_2O_2 in antibakteriell wirksamere Verbindungen $HOSCN$ bzw. $OSCN^-$ um. Dabei ist eine unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Bakterienarten festzustellen (Tenovuo & Pruitt 1984, Welk et al. 2009). Diese Selektivität kann als Ausdruck des regulativen Charakters des Peroxidasensystems verstanden werden (Tenovuo & Pruitt 1984). So sind beispielsweise die H_2O_2 -bildenden Arten weniger sensibel als die Arten die kein H_2O_2 produzieren (Tenovuo & Pruitt 1984). Die Reaktionsprodukte der Speichelperoxidase beeinflussen zunächst die empfindlicheren Arten, aber im zeitlichen Verlauf auch die H_2O_2 -bildenden Arten, womit ein Absinken der H_2O_2 Konzentration einhergeht. Das Vorkommen von H_2O_2 ist essentiell für die Aktivität der Speichelperoxidase und damit stellt es auch die limitierende Komponente dieses Systems dar (Tenovuo & Knuutila 1977, Tenovuo & Anttonen 1980, Pruitt et al. 1982). Mit dem Mangel an Reaktionspartnern geht auch ein Absinken der antibakteriell wirksamen Reaktionsprodukte einher. Andererseits konnten Adolphe et al. (2006) nachweisen, dass die antimikrobielle Effizienz verbessert werden kann, wenn nur eine der drei Komponenten gesteigert wird. Da die antibakterielle Wirkung vor allem auf einer Hemmung beruht (Hoogendoorn et al. 1977, DeMuth et al. 1981, Carlsson et al. 1983, Pruitt & Reiter 1985, Ashby 2008), ist es nicht überraschend, dass die Bakterien nach dem Absinken von $HOSCN$ und $OSCN^-$ (O_2SCN , O_3SCN) wieder aktiv werden. Dies kann spontan geschehen (DeMuth et al. 1981) oder durch Thiole induziert werden (Pruitt et al. 1979). Die Fähigkeit sich von dieser Hemmung zu erholen, hängt von dem $NAD(P)H-OSCN^-$ -Oxidoreduktase-Systems der jeweiligen Art ab (Hoogendoorn et al. 1977, Carlsson et al. 1983).

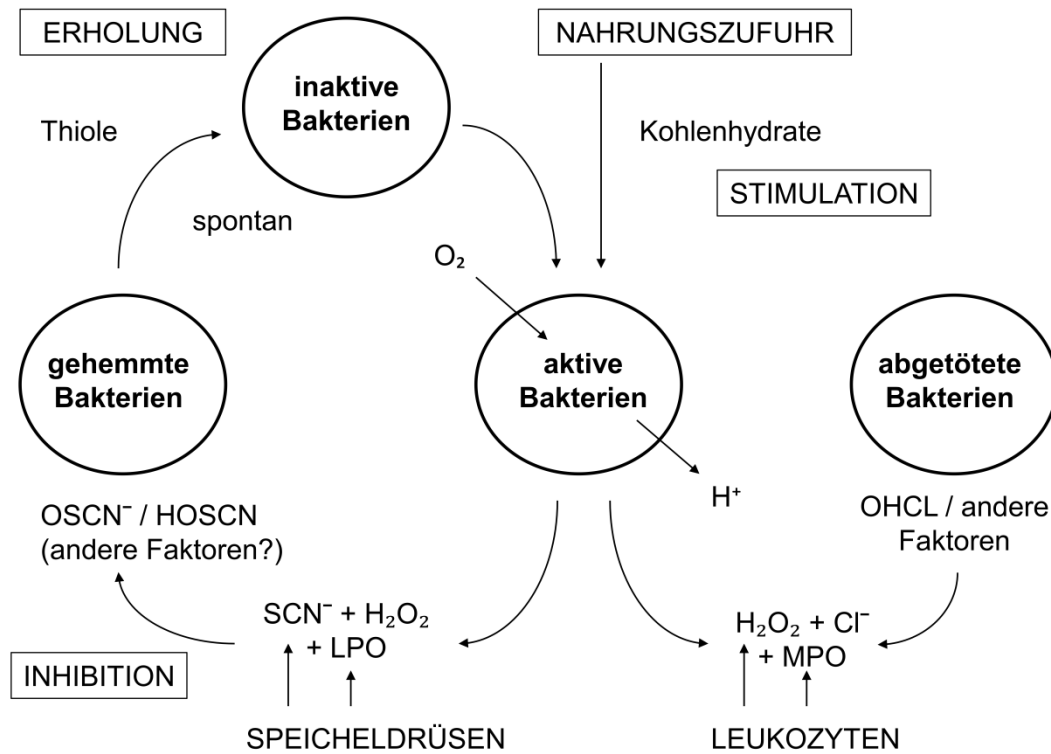


Abbildung 3, Beeinflussung des Bakterienstoffwechsels durch das Peroxidase-System, nach Paetzelt et al.(1984) und Tenovuo & Pruitt (1984).

2.5 Weitere körpereigene antimikrobielle Proteine

Die Wirkung von anderen körpereigenen Proteinen ist von Bedeutung, da diese oft in Kombination mit der Lactoperoxidase in Mundpflegeprodukten Anwendung finden. Zum Beispiel Lactoferrin und Lysozym, diese Proteine sind in Sekreten der Atemwege, in Tränenflüssigkeit und im Speichel nachzuweisen und sind als Teil der unspezifischen Abwehr zu verstehen (Horn 2009). Sie besitzen den Vorteil, dass sie relativ unkompliziert in Zahnpasta oder Mundspülung eingearbeitet werden können und zeichnen sich durch ihre kostengünstige Gewinnung aus bovinem Colostrum aus (Tenovuo 2002). Colostrum ist eine spezielle, sehr gehaltvolle Milch, welche die Kuh kurz vor und nach der Geburt produziert.

Mundpflegeprodukte welche Lactoferrin als auch Lysozym enthalten sind: Biotene[®] Oralbalance[®] (GlaxoSmithKline, Germany), GUM[®] BioXtra[®] (Sunstar, Schweiz) und Zendium[®] Saliva (Unilever, Germany). Wobei die letzten zwei Produkte 'Molke

Extrakt´ oder Colostrum enthalten und damit bovine Immunglobuline, welche jedoch vom Hersteller nicht speziell als Wirkstoff gegen orale Erreger angegeben werden (Tenovuo 2002).

Lactoferrin wurde erstmals in menschlicher Muttermilch nachgewiesen, wirkt als eisenbindendes Protein bakteriostatisch und soll auf diese Weise die Biofilmbildung unterbinden (Singh et al. 2002). Die meisten Bakterien benötigen Eisen für ihr Wachstum. Lactoferrin senkt die lokal verfügbare Menge an freiem Eisen und hemmt daher die Bakterienvermehrung (Horn 2009). Menschliches Lactoferrin bzw. das antimikrobielle Peptidfragment Lactoferrin B kann mittlerweile mittels Klonung und Fermentation von *Aspergillus niger* hergestellt werden (Headon 2000). Zukünftig wird es das bisher aus Kuhmilch gewonnene Lactoferrin ablösen, da es sich als wirksam und sicher erwiesen hat (Headon 2000).

Lysozym ist ein körpereigenes, antibakterielles Enzym, welches sich beispielsweise im Speichel oder Tränenflüssigkeit finden lässt (Horn 2009). Die antibakterielle Eigenschaft beruht auf der Fähigkeit, die Integrität der Bakterienzellwand mittels Hydrolyse von glykosidischen Verbindungen zu stören. Als Folge davon kommt es zur Auflösung der Zelle (Voet et al. 2010, van 't Hof et al. 2014). Ob die Beimengung von Lysozym allerdings sinnvoll ist, bleibt angesichts der klinischen Untersuchung von Hannig et al. (2005), in dem es nach Bindung des Enzyms zu Änderungen der Proteinstruktur und der damit verbundenen Veränderung der Substrataffinität kam, fraglich. Die Studie stellte große intra- und interindividuelle Unterschiede bei der Enzymaktivität von auf einer Pellikelschicht gebundenem, als auch von freiem im Speichel befindlichem, Lysozym fest. Weil die im Speichel befindlichen Peroxidasen die Anhaftung von Streptococccen beeinträchtigen und diverse bakterielle Enzyme inhibieren (Korpela et al. 2002), gehen Hannig et al. (2008) von einer synergistischen Wirkung der beiden Systeme aus. Das resultiert aus der Erkenntnis, dass planktonisch existierende Bakterien wesentlich einfacher durch Lysozym neutralisiert werden können. Aber auch SCN^- als Bestandteil des Peroxidase-Systems verbessert die antibakterielle Wirkung von Lysozym (Pollock et al. 1981, Wilkens et al. 1982, Pollock et al. 1983). Jedoch reicht der physiologische SCN^- Gehalt nicht, um eine Lysozym vermittelte Zelllyse im menschlichen Speichel auszulösen (Lumikari & Tenovuo 1991). In diesem Zusammenhang ist die Studie von Rosin et al. (2001)

besonders interessant. Die Probanden wurden angewiesen, mit einer speziellen Zahnpasta ohne Abrasionsstoffe Zähne zu putzen. Die einzigen Wirkstoffe waren SCN^- und H_2O_2 in unterschiedlichen Konzentrationen. In den Versuchsgruppen mit 0,5 % SCN^- und 0,1 % H_2O_2 und mit 0,1 % H_2O_2 ohne zusätzliches SCN^- war der Rückgang der Gingivitis und die Plaquereduktion stärker ausgeprägt als in den anderen Gruppen. Da bei der Gruppe mit beiden Substanzen die Wirkung am stärksten ausgeprägt war, schlussfolgerten Rosin et al. (2001), dass die Zufuhr an zusätzlichem SCN^- als Ursache für die antiinflammatorische Wirkung angesehen werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Bereitstellung von beiden Reaktionsprodukten das körpereigene Speichelperoxidase-System besser unterstützt, als die alleinige Zufuhr von H_2O_2 . Diese Wirkstoffkombination wurde für eine Folgestudie um 0,145 % Natriumfluorid erweitert und gegen eine im Handel erhältliche Zahnpasta (Colgate Total[®], Colgate Palmolive, Germany) mit Triclosan (0,3 %), Copolymer (2 %) und Natriumfluorid (0,145 %) getestet. Beide Produkte zeigten nach 6 Monaten einen signifikanten Rückgang sowohl des Gingival- als auch des Plaqueindex gegenüber der Baseline. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Zahnpasten festgestellt werden (Rosin et al. 2002).

Es bleibt festzuhalten, dass es im Gegensatz zur Lactoperoxidase keinen Nachweis für eine Aktivität von Lysozym nach der kommerziellen Verarbeitung gibt (Tenovuo 2002). Ebenso kann keine Steigerung der Konzentration von Lactoferrin und Lysozym in Speichel oder Plaque mittels Gebrauch von Lactoferrin und Lysozym enthaltenden Produkten nachgewiesen werden (Tenovuo 2002).

2.6 Produkte auf LPO Basis

Die meisten Studien wurden *in vitro* durchgeführt, wobei oft *S. mutans* als Indikator benutzt wurde. Es wurden aber auch Effekte gegenüber parodontalen Keimen aufgezeigt (Tenovuo 2002). Wenn bei *in vitro* Versuchen aber eine lebensnahe Situation einschließlich oraler Flüssigkeiten nachgestellt wurde, so konnte lediglich eine bakteriostatische Wirkung nachgewiesen werden (Pruitt & Reiter 1985), wobei aber ein breites bakterielles Spektrum abgedeckt werden konnte (Tenovuo 2002).

Biotene® (GlaxoSmithKline, Germany) Zahnpasta enthält zusätzlich zu dem Lactoperoxidase-System (Lactoperoxidase, Kaliumthiocyanat, Wasserstoffperoxid) noch Lysozym und Lactoferrin. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Biotene® Zahnpasta die OSCN⁻ Konzentration 20 Minuten nach dem Zähneputzen auf 200 µMol erhöhen konnte (Lenander-Lumikari et al. 1993). Darüber hinaus führte die tägliche Anwendung von Biotene® Zahnpasta über einen Monat hinweg zu einer leichten Erhöhung der OSCN⁻ Konzentration im unstimulierten Speichel (Lenander-Lumikari et al. 1993). Lenander-Lumikari et al. (1993) und Kirstilä et al. (1994) konnten in der Plaque und im Speichel keine Biotene® induzierten antibakteriellen Effekte bei der Gesamtanzahl der Streptococci, *S. mutans*, Lactobacillen und bei den Anaerobiern feststellen. Laut Kirstilä et al. (1994) konnte auch keine Wirkung von Biotene® auf den pH-Wert der Plaque bzw. auf die Säureproduktion nachgewiesen werden. Bei Laborbedingungen zeigte die Biotene® Zahnpasta eine bessere wachstumshemmende Wirkung bei *S. mutans*, *S. sobrinus* und *L. casei* gegenüber der Zendium® (Unilever, Germany) Zahnpasta (Tenovuo et al. 1991).

Hingegen lieferte die Zendium® Zahnpasta in den klinischen Untersuchungen widersprüchliche Ergebnisse. Während einige Autoren leicht positive Effekte im Hinblick auf die Plaque Neubildung, die Verhinderung von Gingivitis und dem Entstehen von kariösen Läsionen (Koch et al. 1973, Koch & Strand 1979, Rotgans & Hoogendoorn 1979, Schoenfeld et al. 1983, Midda & Cooksey 1986) nachwiesen, konnten beispielsweise Afseth & Rølla (1983) keinen plaqueinhibitorischen Effekt bzw. keine Beeinflussung der Säureproduktion in ihren Untersuchungen erkennen. In einer anderen Studie von Moran & Addy (1984) war auch keine antibakterielle Wirkung gegen *S. mutans* festzustellen. In späteren Untersuchungen mit der Zendium® Zahnpasta bestätigten sie ihre Ergebnisse (Moran et al. 1988). Interessanterweise wurde in keiner Studie der OSCN⁻ Gehalt im Speichel oder in der Plaque gemessen. In einer 2017 veröffentlichten Studie wurde der Einfluss auf das Mikrobiom untersucht. Auch wenn die Autoren von signifikant positiven Veränderungen der Zusammensetzung der Bakterien berichteten, in dem die pathogenen Bakterien reduziert wurden und die kommensalen protektiven Bakterien zugenommen haben, sind diese Veränderungen jedoch als gering einzuschätzen

und deren Auswirkung auf die klinischen Parameter nicht in dieser Studie evaluiert worden (Adams et al. 2017).

Andere Studien untersuchten die Keratinisierung und das Vorhandensein von inflammatorischen Zellen auf der Mundschleimhaut von Patienten mit Xerostomie (Banoczy et al. 1994, van Steenberghe et al. 1994, Toljanic et al. 1996). Da man bei einem Speicheldefizit auch davon ausgehen kann, dass ein Defizit an den im Speichel gelösten Stoffen existiert, sollte eine Anreicherung mit potenziell plaqueinhibierenden Substanzen der oralen Gesundheit zuträglich sein. Bei der kombinierten Anwendung von der Biotene[®] Zahnpasta mit dem Biotene[®] Oralbalance[®] Gel über einen Monat hinweg, konnte eine Verbesserung der Keratinisierung und eine Verminderung der inflammatorischen Zellen festgestellt werden (Banoczy et al. 1994). Betreffend der Biotene[®] Mundspülung existiert eine Untersuchung von Mulligan, Navazesh und Slots (1992), welche bei regelmäßigem Gebrauch einen Rückgang der Gesamtkeimzahl im Speichel feststellen konnten. Allerdings zeigten die Ergebnisse der *in vitro* Versuche von Kielbassa et al. (2000), dass die Biotene[®] Mundspülung sowohl bei intaktem als auch bei bereits demineralisiertem Zahnschmelz zu Demineralisation der Zahnhartsubstanz führte. Sie begründeten ihre Entdeckung mit dem relativ niedrigem pH-Wert von 5,15 und dem Fehlen von Fluoriden in der Mundspülung.

Die Enzykal Zahnpasta von Curaprox[®] (Curaden, Schweiz) hat neben der Lactoperoxidase, wie auch das Produkt von Zendium[®], zwei weitere Enzyme: Amyloglucosidase und Glucoseoxidase. Über eine Enzymkaskade soll für das LPO-System vermehrt H₂O₂ bereitgestellt werden, da diese Komponente als der limitierende Faktor für das Lactoperoxidase-Thiocyanat-Wasserstoffperoxid-System gilt (Tenovuo & Knuutila 1977, Tenovuo & Anttonen 1980, Pruitt et al. 1982). Zur Wirksamkeit dieses Produktes liegen noch keine Veröffentlichungen vor. Das Unternehmen beruft sich derzeit auf den Wirkungsnachweis des LPO-Systems von Hugoson, Koch et al. (1974) und von Midda und Cooksey (1986).

2.7 Zielsetzung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Wirksamkeit eines Lutschdragees basierend auf den Komponenten des Lactoperoxidase-Systems. Das Dragee wurde im Rahmen des Projekts „Large Protection of Oral Health“ als Ergänzung zur mechanischen Zahnreinigung entwickelt und getestet.

In der Zahnmedizin stellt das nicht-mechanische orale Hygiene-Management, unter Berücksichtigung des physiologischen Microbioms, eine besondere Herausforderung dar. Einerseits ist bei pathogenen Keimen eine effektive antibakterielle bzw. plaqueinhibierende Wirkung erwünscht, andererseits soll das kommensale Mikrobiom nicht negativ beeinflusst werden. Das natürliche Speichelperoxidase-System bietet mit seinem selbstlimitierenden und selektiven Eingriff einen guten Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Mundpflegeproduktes.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen einen Beitrag zum Verständnis des Wirkungsspektrums des Lactoperoxidase-Systems liefern. Dazu wurde in einem Probandenversuch die Leistungsfähigkeit, des in einem Dragee nachgebildeten Speichelperoxidase-Systems, gegen eine handelsübliche Mundspüllösung und ein Placebo getestet.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsdurchführung

Zur Untersuchung der Wirksamkeit der Dragees wurde eine randomisierte, doppelt verblindete Studie im 4-fach Cross-over Design eingesetzt. Das Studiendesign orientierte sich am Plaqueaufwuchs-Modell von Addy et al. (1983). Wobei die Verblindung seitens der Probanden nur für die Prüfdragees und das Placebo-Dragee zutraf. Alle Probanden benutzten zeitlich versetzt zwei Lutschdragees in unterschiedlicher Rezeptur, ein Placebo-Dragee als Negativkontrolle und eine handelsübliche Mundspüllösung (Listerine® Total Care, Johnson & Johnson, Germany) als Positivkontrolle in zufälliger Reihenfolge. Das Placebo und die zwei Lutschdragee-Varianten waren hinsichtlich Aussehen, Geschmack und der Darreichungsform nicht voneinander zu unterscheiden. Zwischen den Anwendungen der verschiedenen Präparate lag eine Wash-out-Phase von jeweils 10 Tagen (Newcombe et al. 1995).

Als Probanden (N = 16) wurden gesunde und kariesfreie Studierende der Universität Greifswald im Alter von 18 bis 29 Jahren auf freiwilliger Basis rekrutiert (siehe Tabelle 3). Die Ausschlusskriterien waren: Rauchen, Einnahme von Antibiotika, Gebrauch antibakterieller Mundspüllösungen, akute orale Infektionen und verminderter Speichelfluss. Der Median bezüglich der Anzahl der Zähne lag bei der untersuchten Kohorte bei 28 Zähnen (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3, Alter und Anzahl der Zähne der Probanden

	Mittelwert	SD	Min	Median	Max
Alter	23	7,51	18	22	29
Anzahl der Zähne	28	0,927	24	28	32

An der Studie nahmen insgesamt 16 Probanden (8w und 8m) teil.

Die Einteilung der Probanden in die entsprechenden Gruppen erfolgte randomisiert nach der Erhebung der Baseline Untersuchung. Die jeweiligen Gruppeneinteilungen

wurden im Verlauf der Studie nicht mehr verändert. Am Tag 1 stellten sich die Probanden in der Zahnklinik vor, initial wurde eine Speichelprobe mittels Salivette (Cortisol, Sarstedt, Germany) für die ionenchromatographische OSCN⁻ Bestimmung genommen und auf Eis gelagert. Im Anschluss erfolgte eine professionelle Zahnreinigung bei der sämtliche weichen und harten Beläge entfernt wurden. Die Probanden bekamen die jeweiligen Lutschdragees bzw. die Spüllösung (Listerine[®] Total Care) mit den entsprechenden Instruktionen ausgehändigt, zusätzlich wurden sie angewiesen jegliche Mundhygienemaßnahmen zu unterlassen. Jeder Abpackung waren die Instruktionen schriftlich beigelegt.

Die Lutschdragees mit den Testrezepturen, als auch das Placebo-Dragee bestanden aus zwei Teildragees, die zeitgleich für mindestens 10 Minuten im Mund gelutscht werden sollten. Zur Vereinfachung wird im Folgenden lediglich von einem Lutschdragee gesprochen. Die Anwendung sollte um 8 Uhr (nach dem Frühstück), 11 Uhr, 14 Uhr, 17 Uhr und um 20 Uhr (nach der letzten Mahlzeit) geschehen. Die Mundspülung als Positivkontrolle (20 ml) sollte eine Minute lang, um 8 Uhr (nach dem Frühstück) und um 20 Uhr (nach der letzten Mahlzeit) durchgeführt werden.

Am Tag 3 wurden die Probanden angewiesen, die Anwendung des Präparates um 8 Uhr zu unterlassen und sich stattdessen im Labor zur Probenentnahme einzufinden. Nachdem die Speichelprobe zur OSCN⁻ Bestimmung genommen wurde, durfte das Dragee gelutscht bzw. die Mundspülung durchgeführt werden.

Am Morgen des 5. Tages wurde eine Stunde nach der letzten Lutschdragee-Anwendung eine Speichelprobe für die chemische Analyse mittels Salivette (Cortisol, Sarstedt, Germany) genommen. Im Anschluss wurde der nach Turesky et al. (1970) modifizierte QHI (Quigley & Hein Index) erhoben und die Plaqueentnahme für die mikrobielle Untersuchung durchgeführt (Quigley & Hein 1962). Die Probanden sollte nun innerhalb einer 10 tägigen Wash-out-Phase ihre gewohnte Mundhygiene durchführen.

3.1.1 Erhebung des Quigley & Hein Index

Zur Quantifizierung der neugebildeten Plaquemenge nach der professionellen Zahnreinigung, wurde der Quigley & Hein Index (Quigley & Hein 1962) genutzt. Hierfür wurde die Plaque mittels MIRA-2-TON® (Hager und Werken, Duisburg, Germany) angefärbt. Laut Addy et al.(1999) zeichnet sich dieser Index durch eine hohe Trennschärfe aus. Für eine noch genauere Aussagekraft fand eine Modifizierung des QHI nach Turesky statt (Turesky et al. 1970). Der modifizierte Plaqueindex wurde an den oralen Flächen des ersten und dritten Quadranten und an den vestibulären Flächen des zweiten und vierten Quadranten erhoben. Die ermittelten Punktwerte wurden dann durch die Anzahl der bewerteten Flächen geteilt, um einen Durchschnittspunktwert für jeden Probanden zu erhalten.

3.1.2 Gewinnung und Aufbereitung der Proben

Speichelprobennahme

Die Speichelgewinnung erfolgte mittels Salivette (Cortisol, Sarstedt, Germany). Dazu wurde die Saugrolle aus der Salivette entnommen und für eine Minute locker im Mund bewegt. Anschließend wurde die Saugrolle zurück in die Salivette gegeben, das Ganze mit einem Stopfen verschlossen, auf Eis in einer Styroporkiste gelagert und umgehend ins Labor transportiert. Zur Gewinnung des Speichels wurde die Salivette für zwei Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Für die Analyse wurde der wasserklare Speichel verwendet, der sich nach dem Zentrifugieren in der Salivettenspitze angesammelt hatte.

Plaqueprobe für mikrobiologische Analyse

Die Plaqueentnahme mittels steriler Universalkürette erfolgte an jedem Zahn. Die gewonnene Plaque wurde in abgewogenen und beschrifteten Eppendorfröhrchen abgestreift und nach der letzten Fläche vorsichtig mit einer Sonde tiefer geschoben. Lagerung und Transport der Proben erfolgte ungekühlt.

Das Gewicht der Plaqueproben wurde durch Differenzwägung ermittelt. Dafür wurde das Gewicht des leeren Eppendorfröhrchens im Vorfeld mittels Feinwaage bestimmt und nach der Probenentnahme erneut gewogen. Die Differenz entsprach dem Gewicht der Plaque. Es folgte die Zentrifugierung der Proben, um die Plaque in die Spitze des Eppendorfröhrchens zu befördern. Danach wurde die Plaque in 360 µl physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) durch Vortexen und Ultraschall gelöst.

3.2 Chemikalien

Alle Chemikalien, wie z.B. KSCN, NaSCN, KNO₃, NaNO₃ und Carbamidperoxid hatten, wenn nicht anders ausgewiesen, den Reinheitsgrad z. A. (zur Analyse).

Manitol, Sorbitol, Xylitol, Cellulose, Glycerol, Magnesiumstearat, Siliziumoxid und Aroma hatten den für den Einsatz in Kosmetika erforderlichen Reinheitsgrad.

Die Lactoperoxidase (350 U/mg) wurde von Sternenzym (Deutschland) bezogen.

Für das Ansetzen des Laufmittels und für die Regeneration des Supressors bei der Ionenchromatographie wurden NaOH Lösung 50 - 52 %, H₂SO₄ (beides Fluka, Deutschland) und Reinstwasser verwendet.

3.2.1 Rezepturen

Herstellung der Lutschdragees

Hergestellt wurden die Dragees von der bmp production GmbH (Parchim, Deutschland), einem Produktionsunternehmen für Kosmetika und pharmazeutische Rohstoffe. Da das Verpressen der drei Systemkomponenten LPO, KSCN und Carbamidperoxid zu einem Dragee aus Stabilitätsgründen zum Zeitpunkt des Studienbeginns nicht möglich war, wurden für die Testungen jeweils zwei Teil-Dragees hergestellt, die LPO und Carbamidperoxid bzw. KSCN getrennt enthielten. Die anderen Komponenten (Manitol, Sorbitol, Xylitol, Cellulose, Glycerol,

Magnesiumstearat, Siliziumdioxid und Aroma) waren in gleichen Konzentrationen in beiden Dragees enthalten (siehe Tabelle 4). Um eine optimale Verblindung zu gewährleisten, wurden die Placebo-Dragees ebenfalls in paarweiser Ausführung dem Probanden zur Anwendung übergeben. Es gab keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Dragees (siehe Tabelle 4)

Tabelle 4, Zusammensetzung der Dragees in mg

Inhaltsstoffe	Lutschdragee B		Lutschdragee C		Lutschdragee D (Placebo)	
	LPO/H ₂ O ₂	KSCN	LPO/H ₂ O ₂	KSCN	1a	1b
Manitol	360	360	360	360	360	360
Sorbitol	380	380	380	380	380	380
Xylitol	470	470	470	470	470	470
Cellulose	195	195	195	195	195	195
Glycerol	20	20	20	20	20	20
Mg-Sterat	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5
SiO ₂	15	15	15	15	15	15
Aroma	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
LPO	10	-	10	-	-	-
CPO	3,45	-	1,7	-	-	-
KSCN	-	7,5	-	7,5	-	-
Gewicht	1498	1493	1497	1493	1485	1485

Sowohl die Prüfdragees als auch das Placebo bestand aus zwei Teildragees (1a & 1b), beim Placebo unterschieden sie sich allerdings nicht (1a & 1b).

Listerine[®] Total Care, Johnson & Johnson, Germany

Pro Anwendung wurde mit 20 ml Listerine[®] Total Care gespült. Laut Hersteller enthält Listerine[®] Total Care folgende Wirkstoffe: Menthol (0,042 %), Thymol (0,064 %), Eucalyptol (0,092 %), Salicylsäuremethylester (0,06 %), Ethanol (21,6 % vol).

3.3 Geräte

Für die Versuchsdurchführung wurden folgende Geräte verwendet:

Ionenchromatograph Metrohm Professional IC 850 (Metrohm, Schweiz)

Reinstwasseranlage Purelab ultra (Elga, Deutschland)

Zentrifuge Biofuge primo (Heraeus Instruments, Deutschland)

pH-Messgerät PMX 3000, mit pH-Glaselektrode Sen Tix 21, pH 0-14 (WTW, Deutschland)

Präzisionswaage (Acculab Atilon Sartorius, Deutschland)

Ultraschallbad Sonorex super rk 510 (Bandelin, Deutschland)

3.4 Mikrobiologische Untersuchungen

Die Isolation und Differenzierung der Leitkeime *S. mutans* und Lactobacillen erfolgte semiquantitativ aus der gewonnenen Plaque mittels des kommerziell erhältlichen CRT-Caries-Risk-Tests (Ivoclar-Vivadent, Leichtenstein). Dazu wurden jeweils 50 µl der Plaquesuspension in einer 1:10 Verdünnung (mittels 0,9 % NaCl) auf den CRT-Teststreifen pipettiert. Nach 48 h anaerober Inkubation bei 37 °C wurden die Kolonien ausgezählt. Die aerobe Gesamtkeimzahl (GKZ) wurde in Anlehnung an die Deutsche Industrie Norm (DIN EN ISO 6222) auf Trypton-Soja-Agar nach 48-72 h Bebrütung bei 36 °C bestimmt.

3.5 Ionenchromatographie

Die Bestimmungen von OSCN^- , SCN^- , NO_3^- und NO_2^- aus dem Speichel erfolgten ionenchromatographisch in Anlehnung an Nagy et al. (2007) und Kalmar et al. (2011) nach einer speziell für Speichel entwickelten Methode (Below et al. 2018). Der Ionenchromatograph war mit einem Leitfähigkeits-, einem voltammetrischen- und einem UV-Detektor ausgestattet. Für die Probeninjektion bei 4 °C wurde das Sample Center 889 IC (Metrohm, Schweiz) verwendet, injiziert wurden 10 µl Probenvolumen. Die Trennung der Anionen erfolgte an einer Metrosep A Supp 16 (Metrohm, Schweiz) bei 45 °C. Es erfolgte eine Gradientenelution, als Laufmittel A dienten 100 mmol NaOH, als Laufmittel B wurde Reinstwasser verwendet (Below et al. 2018).

3.6 Statistische Auswertung

Die Modellierung, insbesondere dem Verzicht auf die Annahme eines Carry-over-Effektes, orientierte sich am Standardwerk von Stephen Senn (2002). Bei der Adjustierung auf Baseline Werte wurde neben Senn (2002) den Empfehlungen eines weiteren Standardwerks über Cross-over-Studien gefolgt (Jones & Kenward 2015). Um die Anzahl an Keimen besser interpretieren zu können, insbesondere zwischen den drei verschiedenen Endpunkten für Keime (*S. mutans*, Lactobacillen, Gesamtkeimzahl), wurden zwei Methoden gewählt. Zum einen wurden aus den Regressionskoeffizienten b_j die standardisierten Regressionskoeffizienten β_j berechnet. Sie entsprechen den Regressionskoeffizienten $\beta_{j(z\text{-score})}$ der linearen Regression nach z-Transformation der Variablen (z-Score bzw. standardisierte Variable mit Mittelwert 0 und Varianz 1, wofür der Mittelwert vom beobachteten Wert abgezogen und dann durch die Standardabweichung geteilt wird). Diese Form der Reskalierung ist üblich (Gelman & Hill 2007, Greenland 2009), weist aber Nachteile auf (Greenland 2009). Deshalb wurde das Modell mit den nicht transformierten Regressionskoeffizienten b_j direkt interpretiert, wobei die Standardabweichung der Placebo-Gruppe als Referenz nur für die Interpretation, nicht wie in der ersten Methode bereits bei der Berechnung, gewählt wurde. Diese Standardabweichung ist nicht von den Effekten der vier Gruppen abhängig, wie es der Fall wäre bei der Standardabweichung über alle vier Gruppen.

Die Analyse und der Entwurf der Boxplots erfolgten mit Stata (Version 14.2, StataCorp, College Station (TX)), konkret mit dem Befehl „pkcross outcome, carryover(none)“ bzw. mit dem äquivalenten, aber anders parametrisierten Modell „regress outcome i.treat i.period i.seq i.id#i.seq“ bzw. dem äquivalenten Modell „regress outcome ib(last).treat ib(last).period ib(last).seq ib(last).id#ib(last).seq“.

4 Ergebnisse

4.1 Plaquebildung

Nach vier Tagen zeigte der nach Turesky modifizierte Quigley-Hein-Index (Turesky et al. 1970), dass Listerine[®] und die beiden Drageevarianten im Vergleich mit dem Placebo die Plaquebildung statistisch signifikant gehemmt haben. Erwartungsgemäß hatte die Positivkontrolle A (Listerine[®]) eine größere Hemmung als Prüfdragee B mit einem H₂O₂ Anteil von 0,083 % und Prüfdragee C mit einem H₂O₂ Gehalt von 0,04 %. Beide Varianten zeigten aber eine statistisch signifikant bessere Wirkung als das Placebo (D). Allerdings konnte kein Unterschied hinsichtlich der Plaquehemmung zwischen den beiden Drageevarianten festgestellt werden.

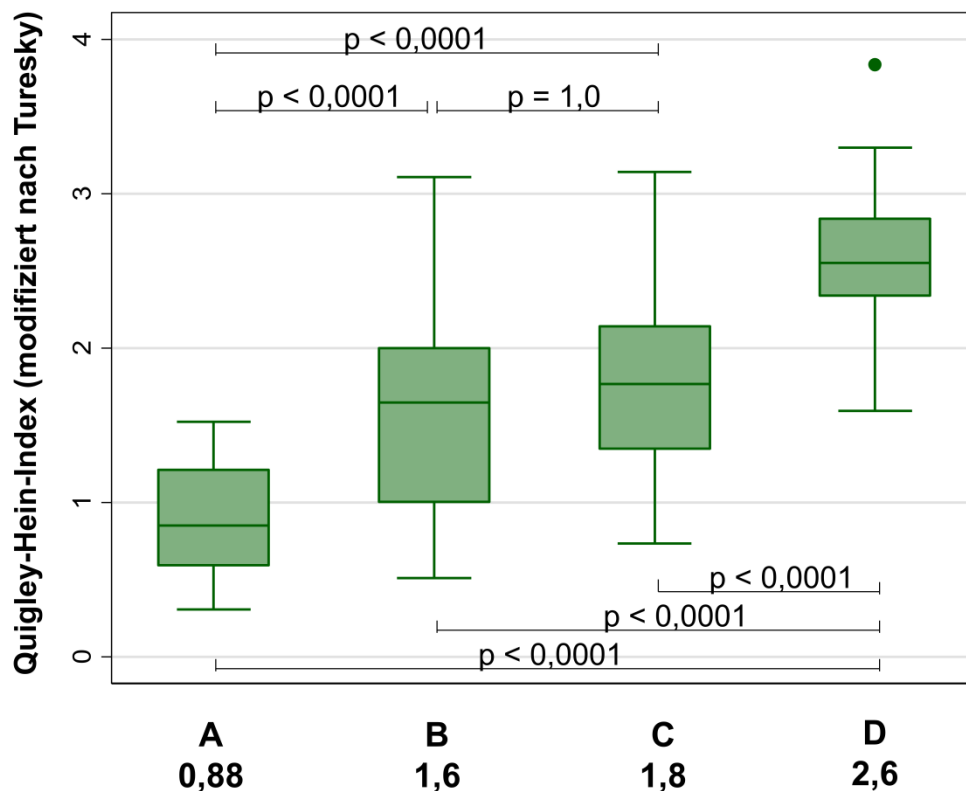


Abbildung 4, Plaqueaufwuchs am 5. Tag mittels Quigley & Hein Index (modifiziert nach Turesky) dargestellt, N = 16. A = Listerine[®], B = Prüfdragee mit 0,083 % H₂O₂, C = Prüfdragee mit 0,04 % H₂O₂ und D = Placebo. Der Faktor „Gruppe“ ist statistisch signifikant ($p < 0,0001$). Angegeben sind die p-Werte nach erfolgter Bonferroni-Korrektur für die 6 paarweisen Vergleiche.

4.2 S. mutans

Prüfdragee B hatte eine größere signifikante Wirkung hinsichtlich der Hemmung von *S. mutans* gegenüber Prüfdragee C und dem Placebo (D). Listerine® (A) wies die größte Streuung der Wirkung hinsichtlich der Hemmung von *S. mutans* auf.

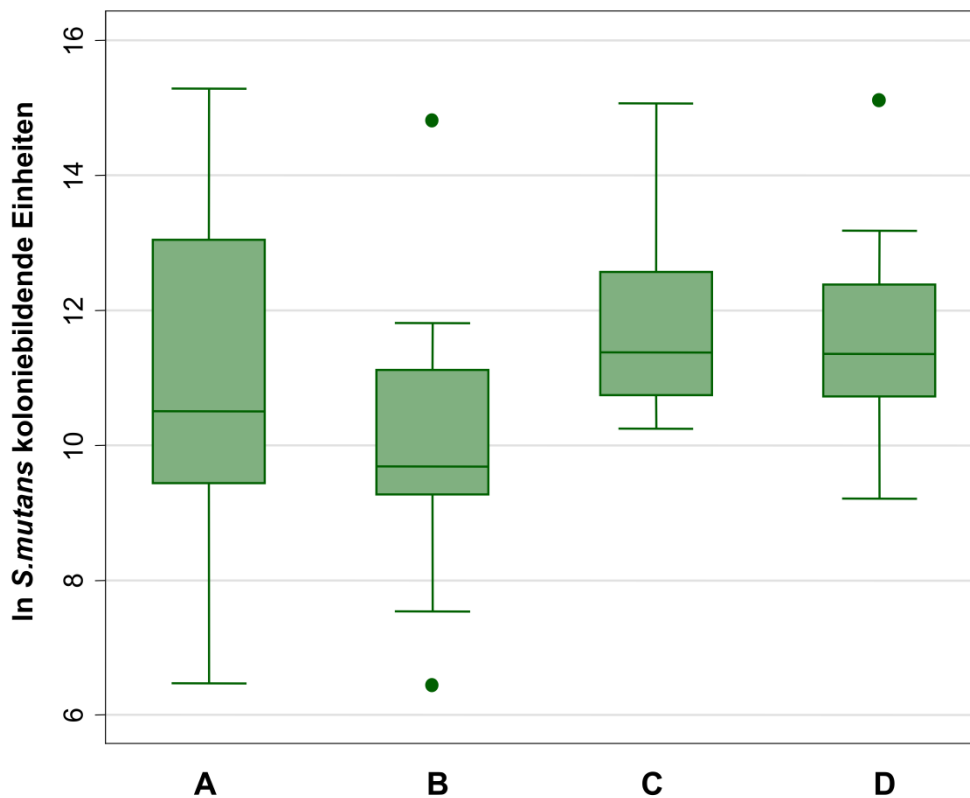


Abbildung 5, Logarithmierte Anzahl koloniebildender Einheiten *S. mutans* am 5. Tag bei der Anwendung von Listerine® (A), Prüfdragee (B), Prüfdragee (C) und Placebo (D). N = 16. Der Faktor „Gruppe“ ist statistisch signifikant ($p = 0,0004$). Die Bonferroni-korrigierten paarweisen Vergleiche ergaben statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen B und C sowie B und D.

Tabelle 5, p-Werte zu Abbildung 5

versus	B	C	D
A	0,1793	0,1949	1,0
B		0,0004	0,0059
C			1,0

Paarweiser Vergleich mit Bonferroni Korrektur $\alpha = 0,05$.

4.3 Lactobacillen

Bei den Lactobacillen zeigte das Prüfdragee C, mit dem niedrigeren H₂O₂ Anteil von 0,04 %, eine statistisch signifikant bessere Wirkung als Listerine[®] (A), Prüfdragee B und dem Placebo (D).

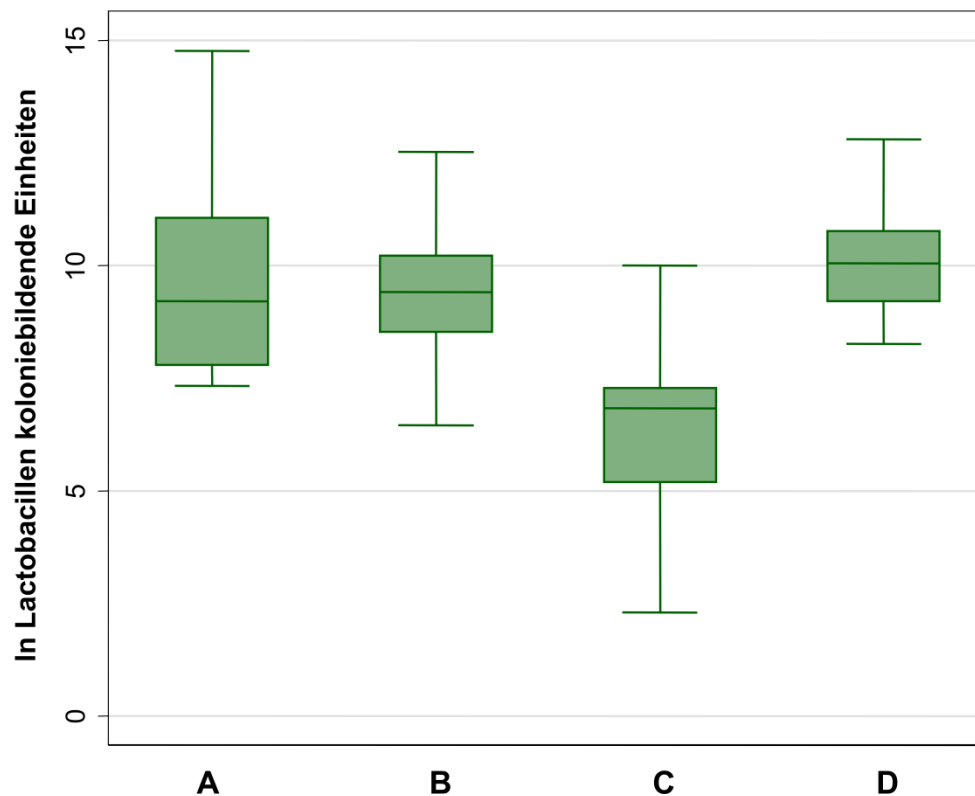


Abbildung 6, Logarithmierte Anzahl koloniebildender Einheiten Lactobacillen am 5. Tag bei der Anwendung von Listerine[®] (A), Prüfdragee (B), Prüfdragee (C) und Placebo (D). N = 16. Der Faktor „Gruppe“ ist statistisch signifikant ($p < 0,0001$).

Tabelle 6, p-Werte zu Abbildung 6

versus	B	C	D
A	1,0	< 0,0001	1,0
B		< 0,0001	0,6429
C			< 0,0001

Paarweiser Vergleich mit Bonferroni Korrektur $\alpha = 0,05$.

4.4 Gesamtkeimzahl

Keines der getesteten Produkte hatte eine statistisch signifikante Wirkung auf die Gesamtkeimzahl. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p = 0,067$).

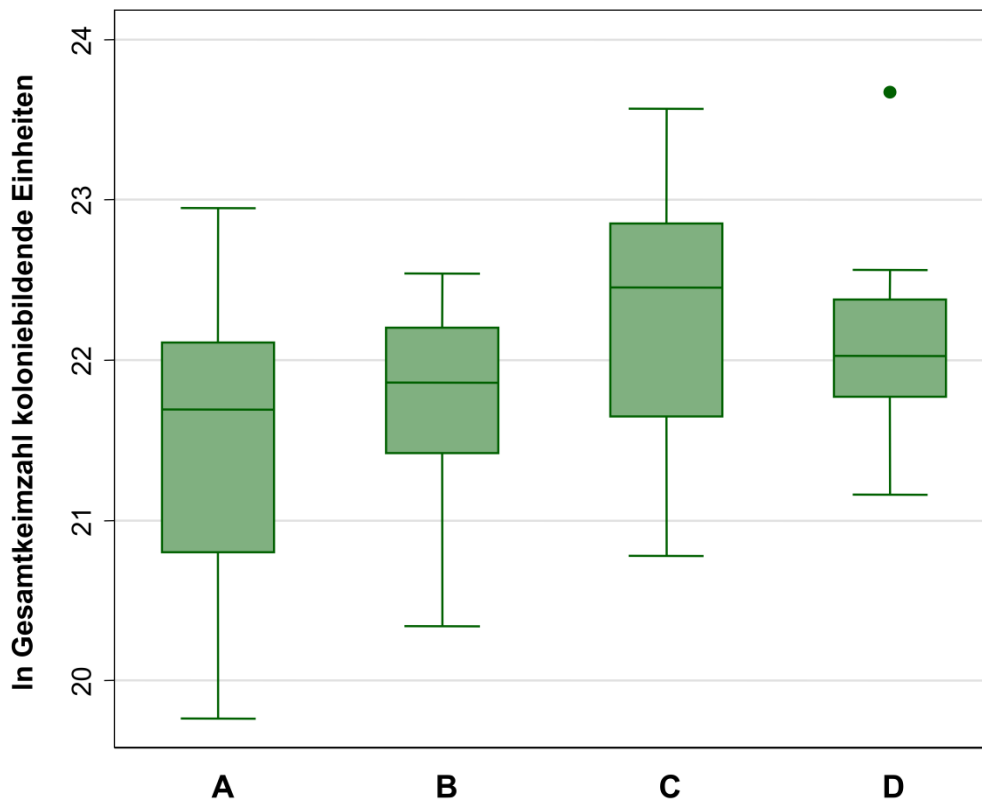


Abbildung 7, Logarithmierte Anzahl koloniebildender Einheiten Gesamtkeimzahl am 5. Tag bei der Anwendung von Listerine® (A), Prüfdragee (B), Prüfgragee (C) und Placebo (D). N = 16.

Tabelle 7, p-Werte zu Abbildung 7

versus	B	C	D
A	> 0,05	> 0,05	> 0,05
B		> 0,05	> 0,05
C			> 0,05

Paarweiser Vergleich mit Bonferroni Korrektur $\alpha = 0,05$.

4.5 Chemische Analyse

OSCN⁻

Am 5. Tag zeigte sich kein signifikanter Unterschied des Gehaltes an OSCN⁻ zwischen den Gruppen. Der OSCN⁻ Gehalt in den untersuchten Speichelproben lag im Bereich von 0,040 - 2,124 mg/l.

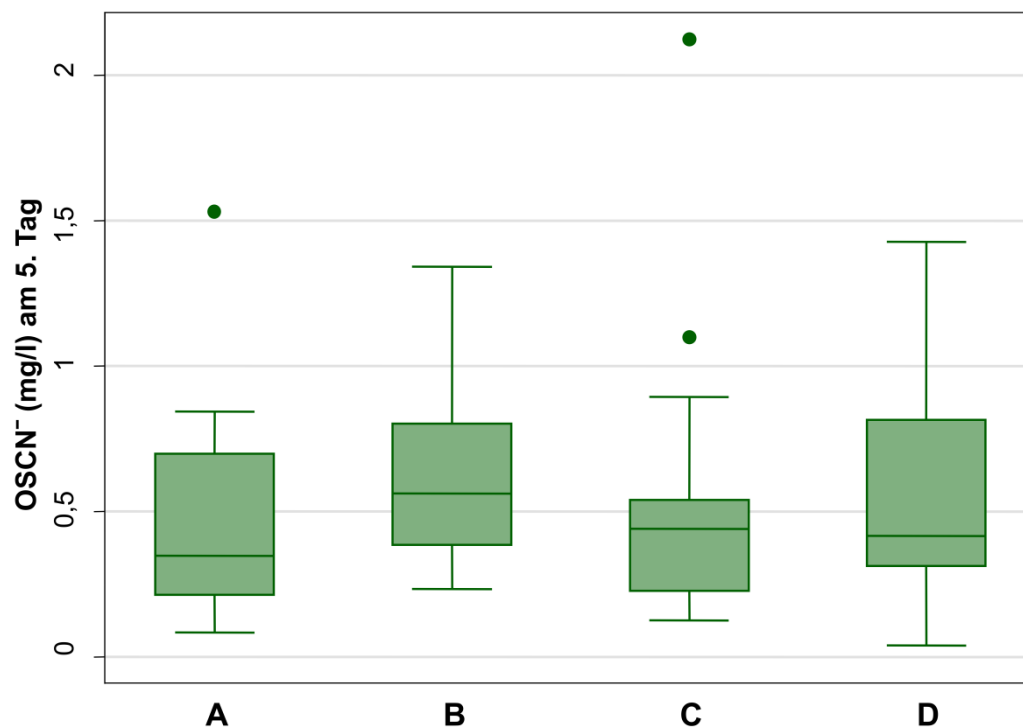


Abbildung 8, OSCN⁻ (mg/l) am 5. Tag bei der Anwendung von Listerine[®] (A), Prüfdragee (B), Prüfdragee (C) und Placebo (D). N = 16.

Tabelle 8, Beschreibende Statistik OSCN⁻ (mg/l) am 5. Tag

Produkt	Mittelwert	SD	Min	p25	p50	p75	Max	IQR
A	0,474	0,379	0,084	0,215	0,350	0,700	1,532	0,485
B	0,616	0,317	0,233	0,386	0,562	0,803	1,343	0,417
C	0,546	0,495	0,126	0,228	0,442	0,541	2,124	0,313
D	0,582	0,387	0,040	0,312	0,417	0,817	1,428	0,504

Tabelle 9, p-Werte zu Abbildung 8

versus	B	C	D
A	> 0,05	> 0,05	> 0,05
B		> 0,05	> 0,05
C			> 0,05

Paarweiser Vergleich mit Bonferroni Korrektur $\alpha = 0,05$.

SCN⁻

Am 5. Tag zeigte sich eine signifikante Steigerung des Gehaltes an SCN⁻ bei der Anwendung der Produkte B und C. Zwischen B und C gab es keine signifikanten Unterschiede. Der SCN⁻ Gehalt in den untersuchten Speichelproben lag im Bereich von 21,6 - 321,9 mg/l.

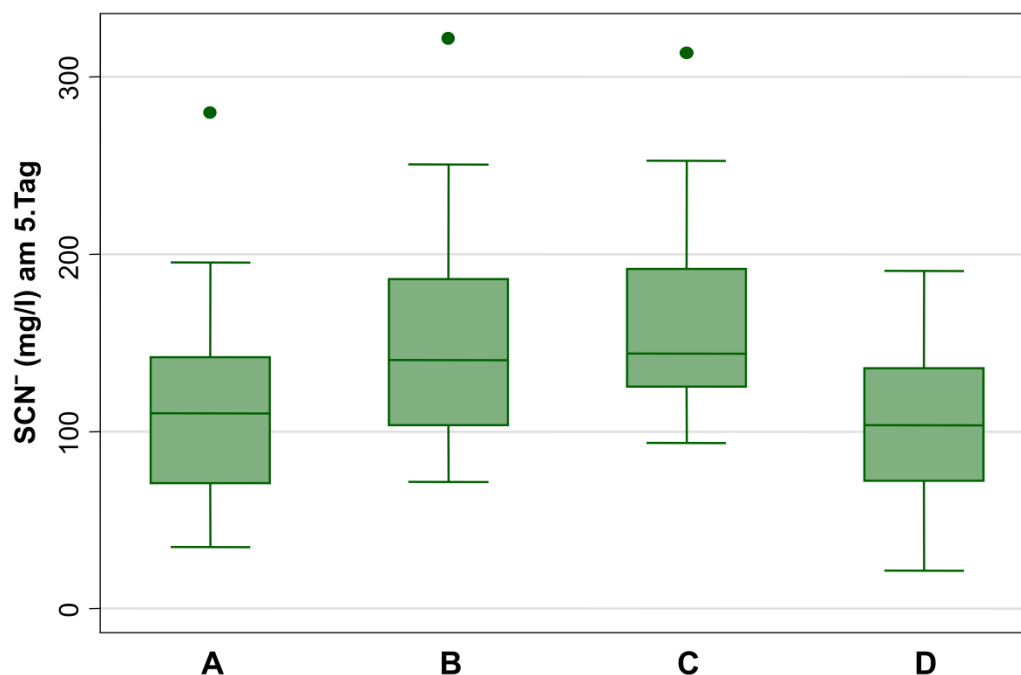


Abbildung 9, SCN⁻ (mg/l) am 5. Tag bei der Anwendung von Listerine[®] (A), Prüfdragee (B), Prüfdragee (C) und Placebo (D). N = 16.

Tabelle 10, Beschreibenden Statistik SCN^- (mg/l) am 5. Tag

Produkt	Mittelwert	SD	Min	p25	p50	p75	Max	IQR
A	113,8	62,5	34,8	70,6	110,2	142,0	279,9	71,5
B	155,0	68,6	71,5	103,7	140,2	186,1	321,9	82,4
C	164,6	60,7	93,7	125,0	144,0	191,7	313,6	66,7
D	103,5	50,2	21,6	72,0	103,4	135,7	190,6	63,7

Tabelle 11, p-Werte zu Abbildung 9

versus	B	C	D
A	0,0268	0,0035	> 0,05
B		> 0,05	0,0051
C			0,0007

Paarweiser Vergleich mit Bonferroni Korrektur $\alpha = 0,05$.

NO₃⁻

Nach 5 Tagen konnte keine signifikante Veränderung des NO₃⁻ Gehalts festgestellt werden. Zur besseren Veranschaulichung werden die Werte sowohl in mg/l also auch in µmol/l angegeben. Die Residuen wiesen eine Normalverteilung auf, was eine Logarithmierung sinnvoll machte und somit eine schärfere Testung der Werte ermöglichte. Nach der Logarithmierung zeigte sich ein signifikanter Abfall beim Vergleich von Produkt A und Produkt B (siehe Abbildung 12 und Tabelle 15 und 16). Produkt C zeigte im Vergleich zu Produkt A, B und D keine signifikante Wirkung.

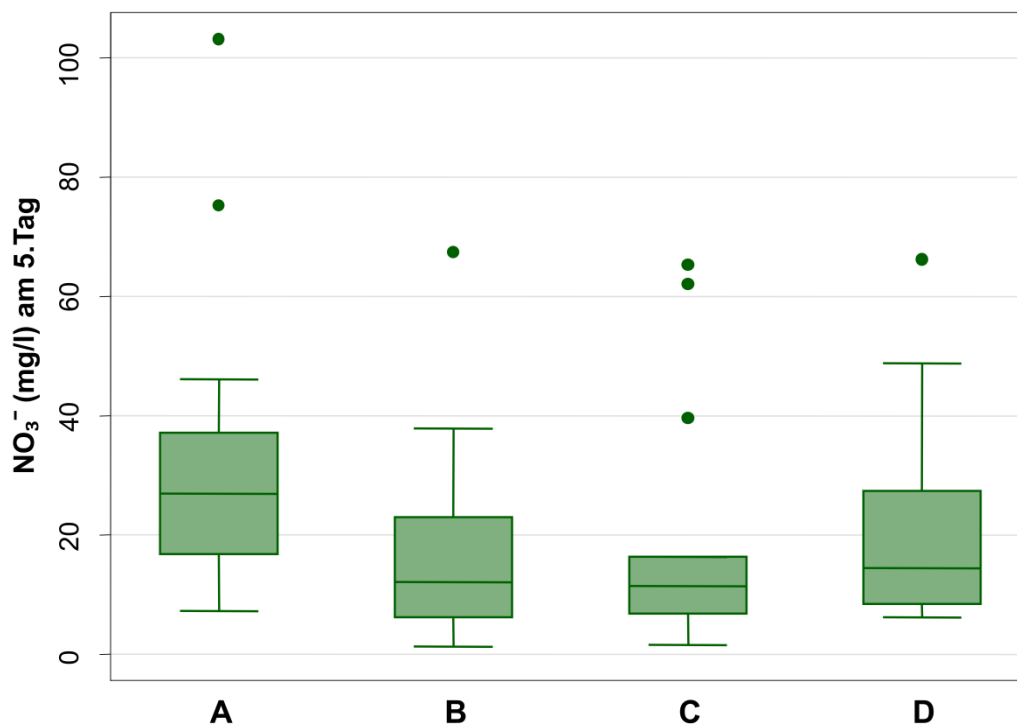


Abbildung 10, NO₃⁻ (mg/l) am 5. Tag bei der Anwendung von Listerine® (A), Prüfdragee (B), Prüfdragee (C) und Placebo (D). N = 16.

Tabelle 12, Beschreibende Statistik NO₃⁻ (mg/l) am 5. Tag

Produkt	Mittelwert	SD	Min	p25	p50	p75	Max	IQR
A	32,15	25,29	7,30	16,71	27,00	37,19	103,11	20,49
B	17,09	16,76	1,38	6,27	12,17	22,99	67,40	16,72
C	18,40	19,64	1,64	6,84	11,54	16,45	65,22	9,61
D	20,86	16,92	6,22	8,44	14,50	27,42	66,18	18,98

Tabelle 13, p-Werte zu Abbildung 10

versus	B	C	D
A	> 0,05	> 0,05	> 0,05
B		> 0,05	> 0,05
C			> 0,05

Paarweiser Vergleich mit Bonferroni Korrektur $\alpha = 0,05$.

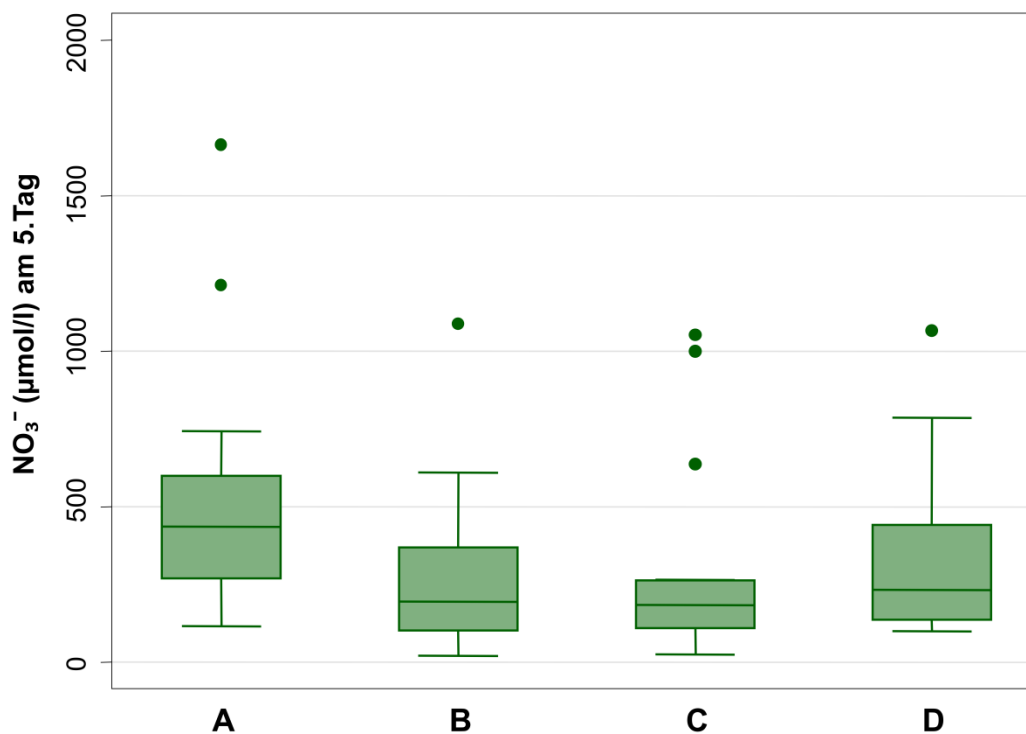


Abbildung 11, NO_3^- ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag bei der Anwendung von Listerine® (A), Prüfdragee (B), Prüfdragee (C) und Placebo (D). N = 16.

Tabelle 14, Beschreibende Statistik NO_3^- ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag

Produkt	Mittelwert	SD	Min	p25	p50	p75	Max	IQR
A	518,57	407,90	117,75	269,50	435,46	599,91	1662,99	330,41
B	275,60	270,32	22,27	101,17	196,26	370,77	1087,14	269,60
C	296,70	316,77	26,50	110,25	186,07	265,28	1051,99	155,04
D	336,43	272,85	100,39	136,12	233,94	442,27	1067,34	306,15

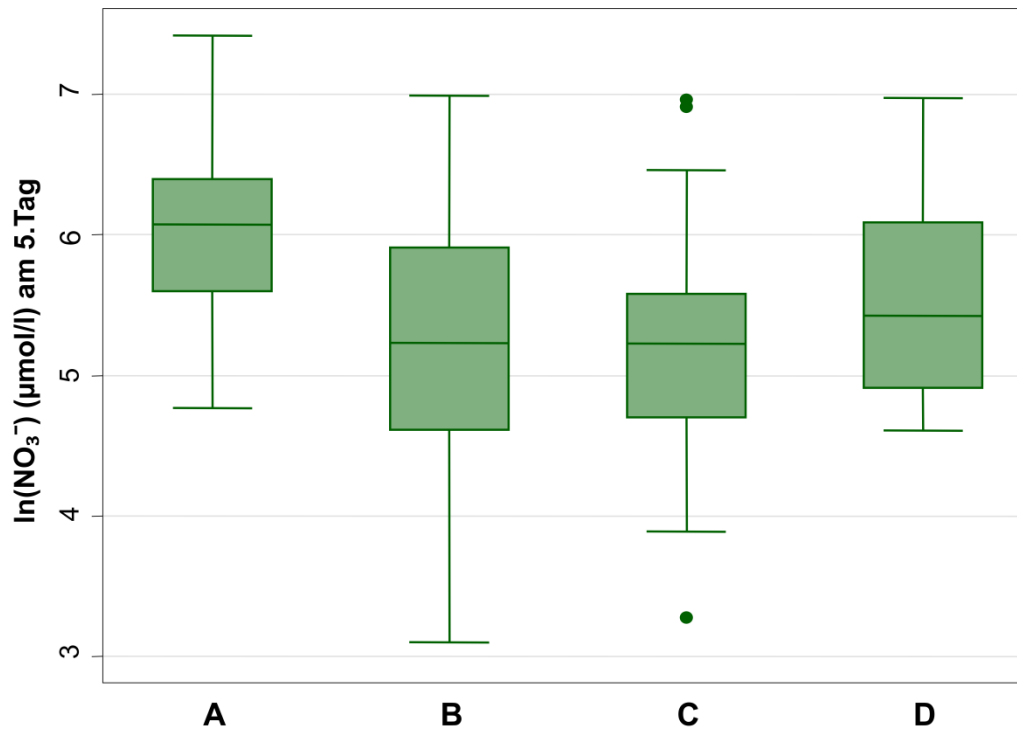


Abbildung 12, $\ln(\text{NO}_3^-)$ ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag bei der Anwendung von Listerine® (A), Prüfdragee (B), Prüfdragee (C) und Placebo (D). N = 16.

Tabelle 15, Beschreibende Statistik $\ln(\text{NO}_3^-)$ ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag

Produkt	Mittelwert	SD	Min	p25	p50	p75	Max	IQR
A	6,01	0,71	4,77	5,60	6,08	6,40	7,42	0,80
B	5,20	0,99	3,10	4,61	5,23	5,91	6,99	1,30
C	5,25	0,98	3,28	4,70	5,23	5,58	6,96	0,88
D	5,55	0,73	4,61	4,91	5,42	6,09	6,97	1,18

Tabelle 16, p-Werte zu Abbildung 12

versus	B	C	D
A	0,0172	> 0,05	> 0,05
B		> 0,05	> 0,05
C			> 0,05

Paarweiser Vergleich mit Bonferroni Korrektur $\alpha = 0,05$.

NO₂⁻

Nach 5 Tagen konnte keine Veränderung des NO₂⁻ Gehalts festgestellt werden. Zur besseren Veranschaulichung werden die Werte sowohl in mg/l also auch in µmol/l angegeben.

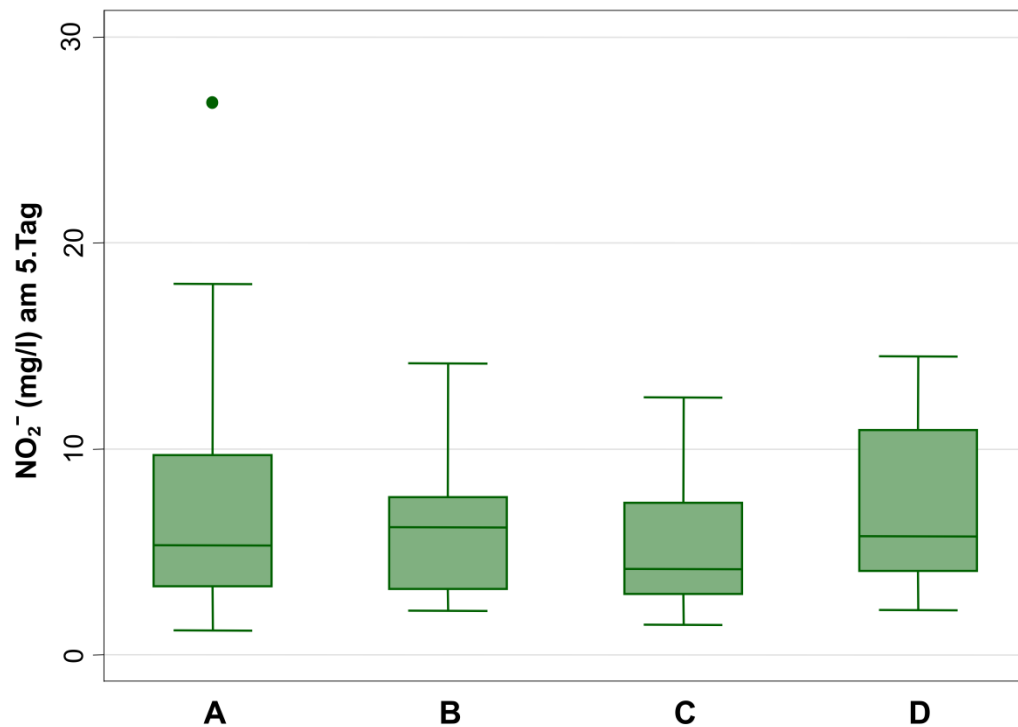


Abbildung 13, NO₂⁻ (mg/l) am 5. Tag bei der Anwendung von Listerine® (A), Prüfdragee (B), Prüfdragee (C) und Placebo (D). N = 16.

Tabelle 17, Beschreibende Statistik NO₂⁻ (mg/l) am 5. Tag

Produkt	Mittelwert	SD	Min	p25	p50	p75	Max	IQR
A	7,59	6,70	1,19	3,31	5,35	9,72	26,84	6,41
B	6,22	3,42	2,17	3,22	6,21	7,66	14,18	4,44
C	5,41	3,24	1,48	2,94	4,18	7,39	12,53	4,44
D	7,20	3,92	2,19	4,10	5,77	10,92	14,51	6,82

Tabelle 18, p-Werte zu Abbildung 13

versus	B	C	D
A	> 0,05	> 0,05	> 0,05
B		> 0,05	> 0,05
C			> 0,05

Paarweiser Vergleich mit Bonferroni Korrektur $\alpha = 0,05$.

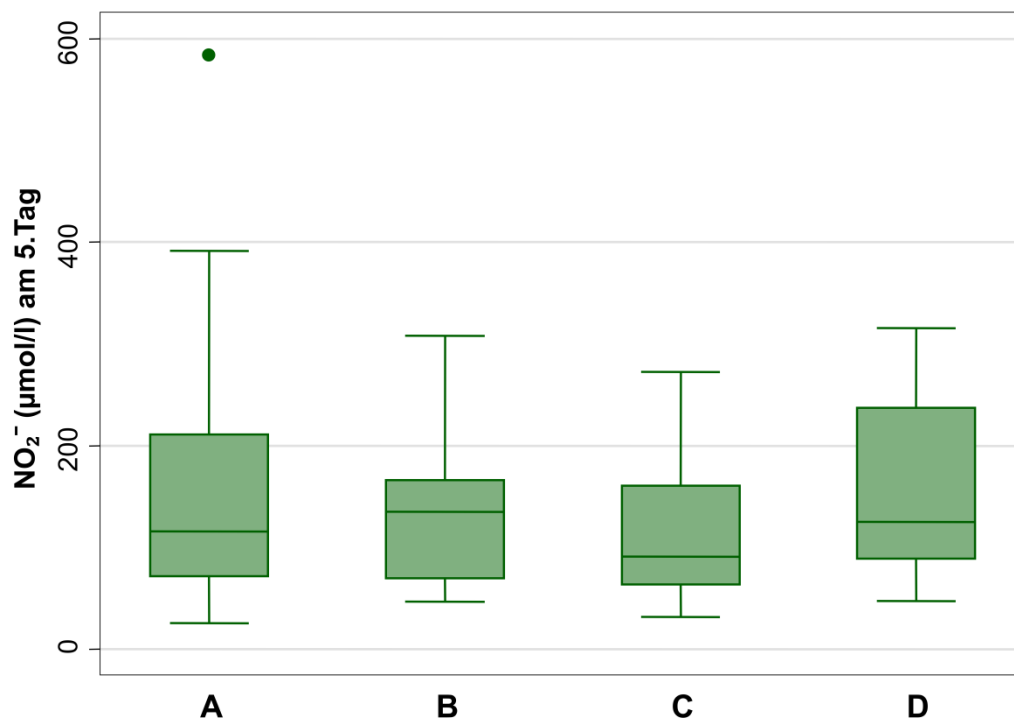


Abbildung 14, NO_2^- ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag bei der Anwendung von Listerine® (A), Prüfdragee (B), Prüfdragee (C) und Placebo (D). N = 16.

Tabelle 19, Beschreibende Statistik NO_2^- ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag

Produkt	Mittelwert	SD	Min	p25	p50	p75	Max	IQR
A	165,00	145,66	25,98	72,02	116,21	211,30	583,48	139,28
B	135,32	74,38	47,20	69,96	134,99	166,56	308,15	96,60
C	117,57	70,43	32,09	64,00	90,89	160,63	272,45	96,62
D	156,45	85,32	47,62	89,16	125,36	237,32	315,41	148,16

NO₃⁻/NO₂⁻

Nach 5 Tagen konnte nur zwischen den Quotienten von Produkt B zu Produkt A ein signifikanter Unterschied ermittelt werden ($p = 0,0123$). Mittels Logarithmierung wurde eine schärfere Testung der Werte durchgeführt. Der Unterschied zwischen Produkt A und B konnte damit noch deutlicher belegt werden ($p = 0,0077$).

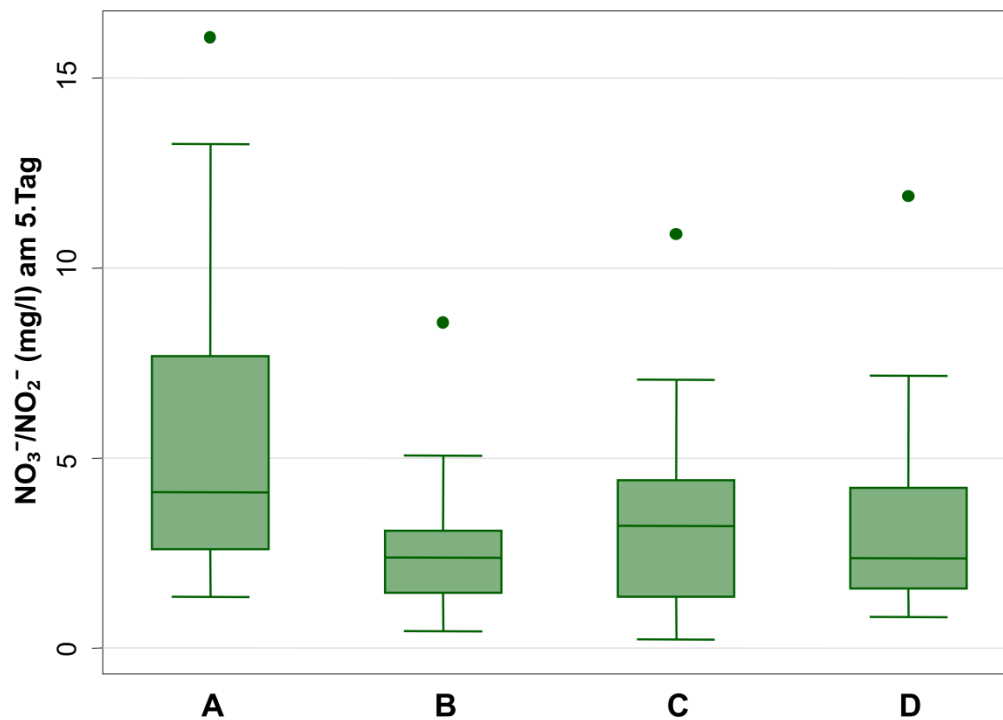


Abbildung 15, NO₃⁻/NO₂⁻ (mg/l) am 5. Tag bei der Anwendung von Listerine® (A), Prüfdragee (B), Prüfdragee (C) und Placebo (D). N = 16.

Tabelle 20, Beschreibende Statistik NO₃⁻/NO₂⁻ (mg/l) am 5. Tag

Produkt	Mittelwert	SD	Min	p25	p50	p75	Max	IQR
A	5,91	4,42	1,35	2,58	4,11	7,68	16,06	5,10
B	2,66	1,97	0,45	1,45	2,39	3,08	8,57	1,63
C	3,54	2,69	0,24	1,34	3,23	4,42	10,88	3,08
D	3,46	2,96	0,82	1,56	2,37	4,22	11,88	2,65

Tabelle 21, p-Werte zu Abbildung 15

versus	B	C	D
A	0,0123	> 0,05	> 0,05
B		> 0,05	> 0,05
C			> 0,05

Paarweiser Vergleich mit Bonferroni Korrektur $\alpha = 0,05$.

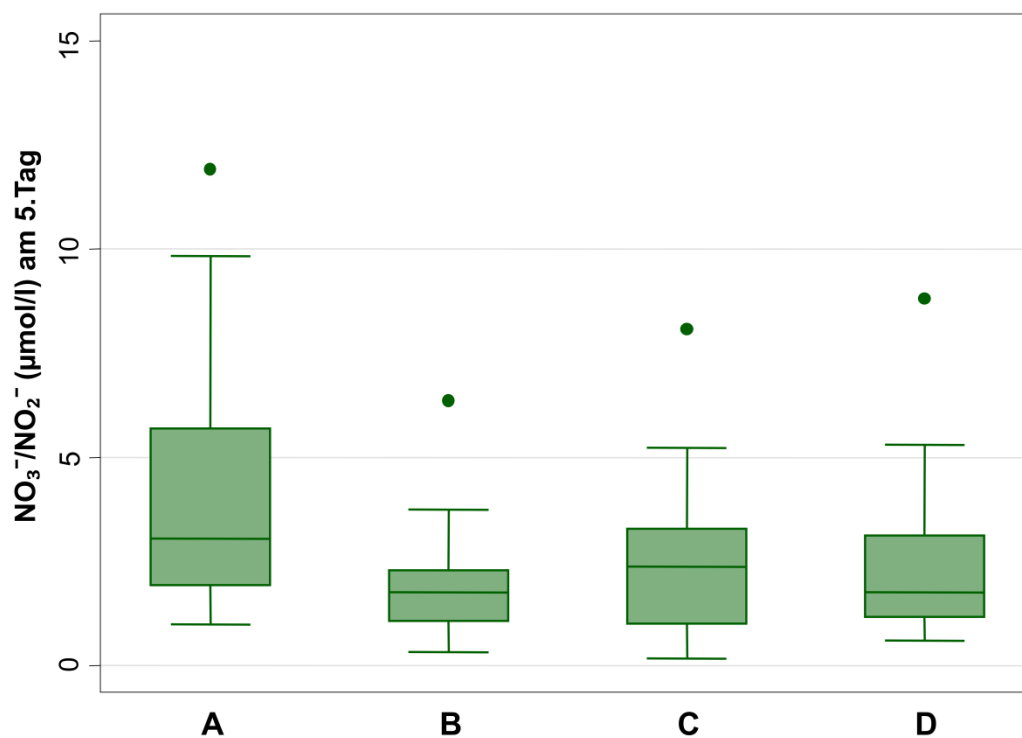


Abbildung 16, NO₃⁻/NO₂⁻ (µmol/l) am 5. Tag bei der Anwendung von Listerine® (A), Prüfdragee (B), Prüfdragee (C) und Placebo (D). N = 16.

Tabelle 22, Beschreibende Statistik NO₃⁻/NO₂⁻ (µmol/l) am 5. Tag

Produkt	Mittelwert	SD	Min	p25	p50	p75	Max	IQR
A	4,38	3,28	1,00	1,92	3,05	5,70	11,92	3,78
B	1,97	1,46	0,33	1,08	1,77	2,29	6,36	1,21
C	2,63	2,00	0,18	1,00	2,39	3,28	8,07	2,29
D	2,57	2,20	0,61	1,16	1,76	3,13	8,81	1,97

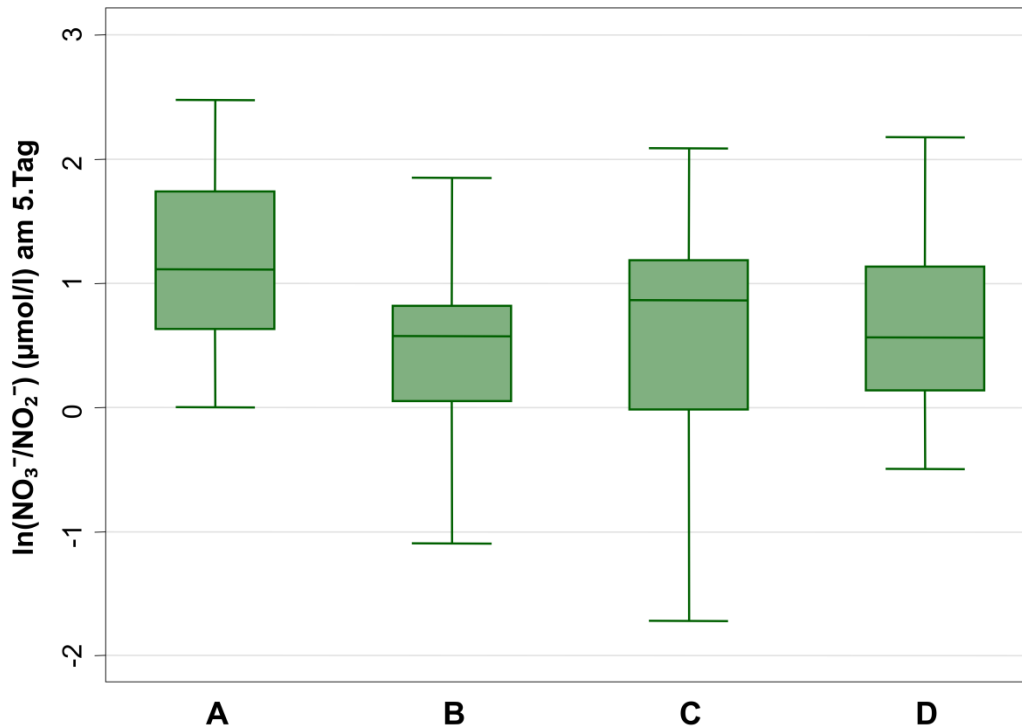


Abbildung 17, $\ln(\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-)$ ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag bei der Anwendung von Listerine® (A), Prüfdragee (B), Prüfdragee (C) und Placebo (D). N = 16.

Tabelle 23, Beschreibende Statistik $\ln(\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-)$ ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag

Produkt	Mittelwert	SD	Min	p25	p50	p75	Max	IQR
A	1,23	0,74	0,00	0,63	1,12	1,74	2,48	1,11
B	0,43	0,76	-1,09	0,05	0,57	0,82	1,85	0,77
C	0,64	0,94	-1,72	-0,02	0,86	1,18	2,09	1,20
D	0,66	0,77	-0,50	0,14	0,57	1,13	2,18	0,99

Tabelle 24, p-Werte zu Abbildung 17

versus	B	C	D
A	0,0077	> 0,05	> 0,05
B		> 0,05	> 0,05
C			> 0,05

Paarweiser Vergleich mit Bonferroni Korrektur $\alpha = 0,05$.

5 Diskussion

5.1 Methodik

Verwendete Chemikalien

Sowohl die Prüfdragees als auch das Placebo beinhalten Xylitol. Dadurch war das Placebo von den Dragees mit dem Prüfgemisch geschmacklich nicht zu unterscheiden. Es ist nicht ganz auszuschließen, dass das Placebo aufgrund des geringen Gehalts an Zuckeralkohol eine antibakterielle Wirkung aufweist. Aber durch den gleichen Xylitol Gehalt in den Prüfdragees sind die Unterschiede auf die Wirkung des LPO-Systems zurückzuführen.

In den Vorversuchen stellte sich Carbamidperoxid (CPO) als bester Wasserstoffperoxid-donator heraus, weshalb CPO auch in der Drageerezeptur verwendet wurde. CPO bietet einen weiteren Vorteil: neben der Bereitstellung von H_2O_2 wird auch Harnstoff generiert. Dies ermöglicht die Resorption des SCN^- Ions in die Mucosa (Wohlrab 1989), wo es die Proliferation als auch die Regeneration verbessert (Kramer & Böhland 1996).

Applikationsform

Die Applikationsform mittels Dragee bietet eine ganze Reihe von Vorteilen gegenüber einer Spülung. So verteilt der Vorgang des Lutschens die Wirkstoffe gleichmäßiger und über einen längeren Zeitraum. Des Weiteren ist diese Anwendungsform viel leichter im Alltag integrierbar als eine Spüllösung und im Vergleich zu Kaugummi ist auch ein wesentlich diskreterer Konsum möglich. Die endgültige Applikationsform soll aus einem Dragee bestehen, welches beide Komponenten beinhaltet. Die Verarbeitung und langzeitstabile Lagerung beider Reaktionspartner in einem Dragee birgt neue Herausforderungen und muss in einer weiteren Studie untersucht werden. In der klinischen Untersuchung wurden daher der Wasserstoffperoxid-donator und das Enzym in separaten Dragees eingearbeitet, um eine vorzeitige Reaktion zu unterbinden.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Plaquebildung

Die Verhinderung der Ausbildung eines etablierten pathogenen Biofilms ist die Schlüsselrolle in der Prävention bakterien-induzierter oraler Erkrankungen. Die Minimierung der Plaqueneubildung war ein Ziel bei der Entwicklung des Dragees, weil planktonisch lebende Bakterien um ein vielfaches sensibler gegenüber körpereigenen Abwehrmechanismen und antibakteriellen Substanzen sind (Larsen 2002, Socransky & Haffajee 2002, Noiri et al. 2003, Marsh 2005). Die Organisation in einem Biofilm erhöht die Toleranz gegenüber diesen Stoffen (Marsh & Bradshaw 1993, Kinniment et al. 1996, Wilson 1996, Pratten & Wilson 1999) und stellt damit eine sehr effiziente Abwehrstrategie der Bakterien dar. Wie effizient das funktioniert, zeigt sich bei dem Goldstandard, der oral angewandten antibakteriellen Substanz, Chlorhexidin. Shani et al. (2000) konnten am Beispiel von *S. sobrinus* zeigen, dass die BIC (biofilm inhibitory concentration) 300-fach höher war, verglichen mit der MBC (minimum bactericidal concentration) planktonisch lebender Zellen. Larsen & Fiehn (1996) zeigten, dass für einen 24 h alten Biofilm von *S. sanguinis* das 10- bis 50-fache der MIC von Chlorhexidin benötigt wird, um die Bakterien zu eliminieren. Mit steigendem Alter des Biofilms ging auch eine gesteigerte Toleranz einher. Damit bestätigten sie die Ergebnisse von Millward & Wilson (1989). Mittels Konfokalmikroskopie zeigten Zaura-Arite et al. (2001), dass Chlorhexidin nur die äußersten Schichten von 24 h bzw. 48 h alter Plaque beeinflusst. Sie vermuteten entweder eine Abnahme der Wirkung an der Oberfläche oder einen Mangel der Penetrationsfähigkeit. Ein derart entwickelter Biofilm ist nicht nur äußerst resistent, er bietet auch die Möglichkeit der Weiterentwicklung einzelner Arten mittels Gentransfer zwischen den Bakterien. Auf diese Weise können neue Resistenzen entstehen oder weitergegeben werden (Gilbert et al. 1997, Ceri et al. 1999, Stewart et al. 2001, Gilbert et al. 2002). Aber auch die Kommunikation untereinander birgt Gefahren. Das von *S. mutans* beim quorum sensing genutzte Peptid (competence stimulating peptide) befähigt das Bakterium, beispielsweise die Zellteilungsfrequenz 10- bis 600-fach gegenüber planktonisch lebenden Zellen zu steigern (Li et al. 2002).

Angesichts der Risiken, welche sich aus einem etablierten Biofilm ergeben, sollten entsprechende Maßnahmen ergriffen werden. Da die Plaquebildung nur bedingt

unterbunden werden kann, muss versucht werden, die Zusammensetzung der plaquebildenden Mikroorganismen zu beeinflussen. Nicht kariogene Bakterien sollten die dominierenden Spezies darstellen und potentiell zahnhartsubstanzschädigende Arten verdrängen.

Um die plaqueinhibierende Wirkung des Dragees sauber herausstellen zu können, wurde in den Placebo-Dragees nicht auf den Zuckeralkohol Xylitol verzichtet, da es nicht auszuschließen war, dass davon eine Wirkung ausgeht. Bisherige Studien ergaben sowohl eine antibakterielle Wirkung gegen *S. mutans* als auch eine plaqueinhibierende Wirkung (Söderling et al. 2008, Söderling & Hietala-Lenkkeri 2010, Salli et al. 2016). Damit kann erklärt werden, warum die Unterschiede in der Performance zwischen den zu prüfenden Rezepturen und dem Placebo weniger hoch ausgefallen sind. Dieses Studiendesign ermöglicht aber, die Ergebnisse direkt auf die Wirkung des LPO-Systems zurückzuführen.

Beide Prüfdragees zeigten eine gute plaqueinhibierende Wirkung, welche sich vom Placebo abhob. Die Werte erreichten aber nicht die der als Positivkontrolle fungierenden Spüllösung. Auffällig war, dass eine Verdoppelung des H₂O₂ Gehaltes (Dragee B: 0,083 % H₂O₂) keine signifikante Auswirkung auf die Plaqueneubildung hatte. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Menge an H₂O₂ in Dragee C ausreichend war, damit das LPO-System effektiv die Plaqueneubildung reduzieren konnte und dass mit einem Gehalt von 0,083 % H₂O₂ im Dragee B keine Steigerung des positiven Effektes zu erzielen war.

Ein Grund für die Inhibierung der Plaqueneubildung ist die Hemmung der Glucosyltransferase (Korpela et al. 2002). Mit diesem Enzym ist es Bakterien möglich, extrazelluläre Polysaccharide, sogenannte Dextrane, aus Saccharose zu synthetisieren. Mittels der adhäsiven Eigenschaften von Dextranen ist ein Anhaften auf der glatten Zahnoberfläche möglich. Speziell die Glucosyltransferase C ist bei der Kolonisation, der saccharoseabhängigen Akkumulation und der Adhäsion von *S. mutans* beteiligt (Loesche 1986, Munro et al. 1991, Schilling & Bowen 1992, Kuramitsu 1993, Fujiwara et al. 1996, Tsumori & Kuramitsu 1997). Auch wenn *S. mutans* kein Primärkeim bei der Biofilmentwicklung darstellt, ist die Verhinderung der

Adhäsion, im Hinblick auf seine kariogene Wirkung, der oralen Gesundheit zuträglich.

Da beide Prüfdragees unterschiedliche Ergebnisse bei *S. mutans* und Lactobacillen erzielten, ist es aber auch durchaus möglich, dass die Inhibierung der Plaqueneubildung auf unterschiedlichen Ursachen beruht. Ciandrini et al. (2016) untersuchten beispielsweise diverse Lactobacillen Stämme auf ihre Fähigkeit, oberflächenaktive Stoffe zu produzieren welche orale Streptococcen daran hindern, einen Biofilm zu etablieren. In diesem Zusammenhang sind nicht nur die Untersuchungen von Ciandrini et al. (2016), sondern auch von Söderling et al. (2011) und Caglar et al. (2006), interessant. Es wurde unter anderem das Konkurrenzverhalten von Lactobacillen gegenüber Mutans-Streptococcen untersucht. Mit dem Ergebnis, dass diverse Lactobacillen das Wachstum bzw. die Anhaftung von *S. mutans* inhibieren können. *L. reuteri* produziert beispielsweise Reuterin, was unter optimalen Bedingungen antibakteriell gegenüber *S. mutans* wirkt (Söderling et al. 2011). Es wäre möglich, dass die oberflächenaktiven Stoffe, welche Ciandrini et al. (2016) gefunden haben, eine Wirkung auf die Glykosyltransferase B, C und D haben. Diese sind entscheidende Bausteine in der Etablierung eines Biofilms (Colby & Russell 1997). Diverse Studien beschäftigten sich bereits mit der Struktur bzw. Möglichkeiten der Inhibition dieses Enzyms (Shani et al. 2000, Wright et al. 2002, Vujicic-Zagar et al. 2010). Wright et al. (2002) konnten beispielsweise die Wirksamkeit unterschiedlichster Inhibitoren nachweisen.

Angesichts der Komplexität der verschiedenen Faktoren ist es durchaus denkbar, dass die Minimierung der Plaqueaufwachsung bei Produkt B mit der inhibierenden Wirkung oberflächenaktiver Stoffe und dem eventuell nicht umgesetztem H_2O_2 zustande gekommen sein könnte. Bei Produkt C könnte die effektive Produktion von $OSCN^-$ (eine Substrathemmung war unwahrscheinlicher als bei Produkt B) zu diesem Effekt geführt haben und mit der Hemmung der Lactobacillen könnte es zu einem Selektionsvorteil für *S. mutans* gekommen sein. Außerdem ist es *S. mutans*, bei entsprechender Versorgung mit Saccharose möglich, die durch $OSCN^-$ erzielte Hemmung zu überwinden (Ashby et al. 2009). Diese Theorie sollte in weiterführenden Studien überprüft werden.

5.2.2 *S. mutans*

Das grampositive und fakultativ aerobe/anaerobe Bakterium *S. mutans* gehört nicht unmittelbar zu den Pionierkeimen. Es ist allerdings fähig mittels Glycosyltransferase extrazelluläre Polysaccharide, so genannte Dextrane, zu bilden. Diese Dextrane ermöglichen ein Anhaften auf der glatten Zahnoberfläche. Zusätzlich bilden sie auch die Grundlage für die Entwicklung einer organischen Matrix. Somit ist die Reduktion/Inhibierung von *S. mutans* nicht nur durch die hohe Kariogenität von höchstem Interesse (Ranke & Ranke 1971). Auffällig ist die, wenn auch aufgrund der großen Streuung nicht statistisch signifikanten, erzielten Reduktionen bei der Positivkontrolle (A, Listerine[®] Total Care). Mögliche Erklärungsansätze könnten im Studiendesign ihre Ursache haben. Bei der vorliegenden Untersuchung handelt es sich um eine *in vivo* Studie und es kann davon ausgegangen werden, dass innerhalb der Probanden eine breite Streuung von diversen *S. mutans* Unterarten mit differierenden Sensibilitäten gegenüber Listerine[®] repräsentiert war. Umso höher sind unter diesem Aspekt die erzielten Werte des Dragees B einzuordnen. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten lag zwar auf dem Niveau von Listerine[®], allerdings war die Streuung der Werte weitaus geringer. Produkt B hatte somit ein breiteres Wirkspektrum als Produkt A. Es ist aber anzumerken, dass Dragee C mit einem H₂O₂ Ausgangsgehalt von 0,04 % eine ähnliche Wirkung wie das Placebo (D) aufwies. Es kann vermutet werden, dass die erzielte Wirkung von Dragee B auf die Erhöhung des H₂O₂ Gehaltes zurückzuführen ist. Möglicherweise kommt es bei der gewählten H₂O₂ Konzentration auch zu einer zytotoxischen Wirkung. In diesem Zusammenhang sollte die Studie von Thomas & Pera (1983) nicht unerwähnt bleiben. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Mutans-Streptococci unter der Gabe von Glucose bis zu 2 mMol H₂O₂ in ihrem Wachstumsmedium anreichern können. Derzeit sind 34 Genotypen von *S. mutans* bekannt, wobei keine Einordnung hinsichtlich der jeweiligen Pathogenität vorliegt (Momeni et al. 2016). Aus diesem Grund kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass eine bakteriostatische Wirkung durch das LPO-System vorlag. Weil die antibakterielle Wirkung des LPO-Systems auf einer Hemmung der Bakterien beruht (Hoogendoorn et al. 1977, DeMuth et al. 1981, Carlsson et al. 1983, Pruitt & Reiter 1985, Ashby 2008) und die Verfügbarkeit von H₂O₂ die limitierende Komponente des Systems darstellt (Tenovuo & Knuutila 1977, Tenovuo & Anttonen 1980, Pruitt et al. 1982), ist es möglich, dass die durch

Dragee B bewirkte Hemmung zumindest in der initialen Phase auch auf H_2O_2 beruht und somit effektiver bzw. länger anhaltend sein könnte, als die Wirkung von Dragee C. In der *in vitro* Studie von Kreth et al. (2008) konnte gezeigt werden, dass *S. mutans* widerstandsfähiger gegenüber diversen antimikrobiellen Substanzen ist, wenn das Medium Saccharose enthielt. Dies wurde auf die Produktion von extrazellulären Glukanpolymeren zurückgeführt. Die Untersuchung von Ashby et al. (2009) ergab Hinweise, dass *S. mutans* bei einer ausreichenden Menge an Saccharose fähig ist, die Hemmung des LPO-Systems zu überwinden. Da es sich bei der vorliegenden Untersuchung um eine *in vivo* Studie handelt, ist das Vorhandensein von Saccharose recht wahrscheinlich. Entsprechend dem Stand der Literatur sind mehrere Interpretationsansätze für das vorliegende Ergebnis möglich.

5.2.3 Lactobacillen

Neben *S. mutans* ist auch das Vorhandensein von Lactobacillen eng mit der Kariogenese verbunden (Marsh 2012). Aus diesem Grund wurde die spezielle Wirkung auf Lactobacillen untersucht. Interessanterweise erzielten die Positivkontrolle (A), das Dragee B und das Placebo (D) ähnliche Ergebnisse. Lediglich Dragee C zeigte eine statistisch signifikante Reduktion der Lactobacillen.

Diese Ergebnisse stehen im scheinbaren Widerspruch zu den Schlussfolgerungen der Ergebnisse von *S. mutans*. Die erzielten Werte bei *S. mutans* ließen die Interpretation zu, dass vorwiegend H_2O_2 für die Reduktion verantwortlich sein könnte. Anders verhält es sich bei den Lactobacillen, sie sind unter anderem als Wasserstoffperoxidproduzenten bekannt (Chooruk et al. 2017). Die Menge ist allerdings so gering, dass sie selbst nicht beeinflusst werden (Strus et al. 2006, Mendi & Aslim 2014). Chooruk et al. (2017) konnten eine unterschiedliche Sensitivität diverser oraler Lactobacillen gegenüber H_2O_2 (1 mmol/l) feststellen. *L. fermentum*, *L. paracasei* und *L. rhamnosus* zeichneten sich beispielsweise durch eine hohe H_2O_2 Toleranz aus, während *L. salivarius*, *L. oris* und *L. gasseri* die gleiche Behandlung nicht überlebten. Der zugrundeliegende Mechanismus ist derzeit noch unklar. Auffällig ist, dass es auch innerhalb der resistenteren Lactobacillen (*L.*

fermentum, *L. paracasei* und *L. rhamnosus*) Unterschiede gab, so waren die Unterarten signifikant resistenter gegenüber H_2O_2 , welche aus einem kariesfreien Milieu gewonnen wurden (Chooruk et al. 2017). In der vorliegenden Studie wurde keine Spezifikation hinsichtlich der Lactobacillen durchgeführt. Aufgrund der H_2O_2 Toleranz diverser Lactobacillen Stämme kann angenommen werden, dass ein höherer nicht umgesetzter H_2O_2 Gehalt in Produkt B keine direkte Wirkung hatte. Ein hoher H_2O_2 Gehalt kann sich allerdings negativ auf die Enzymaktivität auswirken. So könnte die geringe Wirkung von Produkt B mit einer Substrathemmung in Zusammenhang stehen. Bei Produkt C ist eine Substrathemmung weniger wahrscheinlich, womit sich das positive Ergebnis deuten lässt.

Schon bei den Ergebnissen von *S. mutans* zeichnete sich ein Zusammenhang zwischen Wirkung und H_2O_2 Gehalt ab, womit auch eine direkte antibakterielle Wirkung nicht auszuschließen ist. Wie schon erwähnt, kann davon ausgegangen werden, dass ein hoher H_2O_2 Ausgangsgehalt auf die Gesamtzahl der Lactobacillen nur einen geringen Einfluss hatte. Es ist aber durchaus möglich, dass die Wirkung von Produkt B bei *S. mutans* auf die direkte Wirkung von nicht umgesetztem H_2O_2 zurückzuführen sein könnte und Produkt C nicht ausreichend $OSCN^-$ produziert haben könnte um eine Wirkung hinsichtlich *S. mutans* zu erzielen. Die Menge an $OSCN^-$ aber ausreichend ist, um einen positiven Effekt bei Lactobacillen zu erreichen. Um die Zusammenhänge klarer herausarbeiten zu können, sind weitere klinische Studien mit einer Differenzierung der Leitkeime notwendig.

5.2.4 Gesamtkeimzahl

Hinsichtlich der Gesamtkeimzahl zeigte keines der Produkte eine signifikante unterschiedliche Wirkung. Bezüglich der Prüfdragees entspricht das den Erwartungen, da eine Gesamt-Keimreduzierung nicht das Ziel der Entwicklung war. Vielmehr soll das Produkt regulierend in die Bildung eines ausbalancierten, homöostatischen Biofilms eingreifen, in dem es dem kommensalen Mundmicrobiom einen Vorteil verschafft und die Bildung eines pathogenen Biofilms hemmt.

Es kann festgestellt werden, dass Karies-pathogene Keime, wie *S. mutans* (durch Prüfdragee B) und Lactobacillen (durch Prüfdragee C) in ihrer Proliferation gehemmt wurden, ohne dabei die Gesamtkeimzahl statistisch signifikant zu beeinflussen.

5.2.5 Chemische Analyse

Die chemische Analyse mittels Ionenchromatographie ermöglichte interessante Einblicke in die SCN^- , OSCN^- , NO_3^- und NO_2^- Gehalte im Speichel während der Studie. So konnten indirekte Rückschlüsse auf die Veränderung der Bakterienzusammensetzung gezogen werden. Es ist auffällig, dass die Produkte B und C scheinbar keine Auswirkungen auf den OSCN^- Gehalt hatten. OSCN^- ist hoch reaktiv und in einem biologischen System daher nicht langlebig. Es muss daher mit einer Konzentrationsabnahme *in vivo* gerechnet werden. Hierzu existieren keine Studien, zwar konnten Hoogendorn et al. (1977) und Thomas et al. (1980, 1981) in ihren *in vitro* Untersuchungen einen OSCN^- Anstieg zeigen, aber kinetische Studien stehen noch aus.

Die Erhöhung des SCN^- Wertes kann als Reaktion auf die erhöhte Verfügbarkeit der anderen Reaktionspartner interpretiert werden. Wie zuvor beschrieben, kann der Körper SCN^- synthetisieren und für Tenovuo & Makinen (1976) bestand der einzige Grund für das Vorkommen von SCN^- im menschlichem Speichel, in der Funktion als oxidierbarer Co-Faktor im Peroxidase-System. Der erhöhte Wert kann aber auch durch das im Präparat enthaltene SCN^- zustande gekommen sein.

Es konnte keine signifikante Veränderung bei den NO_3^- und NO_2^- Gehalten festgestellt werden, dies ist auch soweit nicht verwunderlich, da das Vorkommen weitestgehend von der Ernährung abhängt (Doel et al. 2004). Eine Veränderung im $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ Verhältnisses deutet darauf hin, dass das Produkt B im Gegensatz zu Listerine® die nitratreduzierenden Bakterien nicht hemmt. Bei der Untersuchung des $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ Verhältnisses wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Listerine® und dem Produkt B, nicht aber zu C und D gefunden (siehe Abbildungen 15 - 17 und Tabellen 20 - 24).

Die Reduktion von NO_3^- zu NO_2^- ist der erste Schritt des Nitrat-Nitrit-NO-Pfades. Dieser stellt eine zusätzliche Quelle für NO, neben dem klassischen L-Arginin-NO-Synthese-Pfad, dar (Lundberg et al. 2008). Leukozyten sind in der Lage NO zu synthetisieren. Diese Fähigkeit wird auch als Schlüsselstelle des menschlichen Abwehrsystems angesehen (Panaro et al. 2003). Im menschlichen Körper existiert eine weitere Quelle für NO, mit Hilfe von oralen Bakterien kann mit der Nahrung aufgenommenes NO_3^- über NO_2^- zu NO reduziert werden (Lundberg et al. 2004, Doel et al. 2005). Dieser Prozess wird von einer Darm-Speichel-Zirkulation unterstützt, in dem ein Teil des NO_3^- aktiv aus dem Darm aufgenommen und zehnfach konzentriert wieder in den Speichel abgegeben wird (Spiegelhalder et al. 1976, Knight et al. 1987). Angesichts dieser Zirkulation gehen Doel et al. (2005) von einer symbiotischen Beziehung zwischen Bakterien und Wirt aus. Des Weiteren wird vermutet, dass die aus der Reduktion von NO_2^- entstehenden Oxide (vor allem NO) in großen Mengen eine antibakterielle Wirkung im Mundraum (Allaker et al. 2001, Doel et al. 2004), im Herz (Weitzberg & Lundberg 1998), in der Harnblase (Carlsson et al. 2001), im Magen (Benjamin et al. 1994) und auf der Haut (Weller et al. 2001) haben und somit ein Teil des angeborenen Abwehrsystems darstellen (Doel et al. 2005). Doel et al. (2005) konnten mittels 16s rDNA Sequenzierung folgende nitratreduzierenden Bakterien auf der menschlichen Zunge nachweisen: *Veillonella atypica*, *Veillonella dispar*, *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces naeslundii*, *Rothia mucilaginosa*, *Rothia dentocariosa* und *Staphylococcus epidermidis*. Die Autoren sehen *Veillonella spp.* als die wichtigste Gattung im Hinblick auf Nitratreduktion in der Mundhöhle an. Die Fähigkeit der Denitrifikation tritt vor allem bei fakultativen oder auch mikroaerophilen Organismen auf, zeigt sich aber auch bei Aerobiern (Doel et al. 2005), wobei die strikt anaeroben Organismen (*Veillonella spp.*) in der Mundhöhle für den höchsten NO_3^- Umsatz sorgen (Doel et al. 2005). Die Autoren entnahmen ihre Proben sowohl von der Zunge, als auch aus Plaque von den Zähnen. Die größere Anzahl an nitratreduzierenden Bakterien fanden sie auf der Zunge, da die papilläre Anatomie der Zunge ihnen ein optimales Habitat bietet. Die Applikationsform als Dragee ist durch ihren vermehrten Kontakt mit der Zunge daher optimal. Die Förderung dieser Bakterien führt zu einer Menge positiver Effekte, so konnten Doel et al. (2004) einen signifikanten Zusammenhang zwischen NO_3^- im Speichel, dem Vorkommen von nitratreduzierenden Bakterien und der Kariesaktivität

zeigen. In einer späteren Studie zeigte sich aber auch eine hohe Variabilität zwischen den Probanden im Hinblick auf das Vorkommen von nitratreduzierenden Bakterien, was aber auch an individuellen Ernährungsgewohnheiten gelegen haben kann (Doel et al. 2005).

Es besteht seit langem der Verdacht, dass ein Zusammenhang zwischen Parodontitis und kardiovaskulärer Gesundheit existiert, diese Verbindung könnte im Vorhandensein von nitratreduzierenden Bakterien und damit einer erhöhten Verfügbarkeit an NO begründet sein (Hyde et al. 2014). Passend dazu vermuteten Allaker et al. (2001) einen Einfluss von NO_2^- im Speichel auf Parodontitis. Auffällig ist, dass gerade die strikten Anaerobier, welche mit chronischer Parodontitis assoziiert werden, NO_2^- eher zu Ammoniak statt zu NO abbauen (Hyde et al. 2014). Auch wenn der Zusammenhang zwischen NO_3^- und NO_2^- induzierter Blutdrucksenkung, durch die Reduktion zu NO, noch nicht komplett verstanden ist (Cosby et al. 2003), kann dennoch vermutet werden, dass bei entsprechender Versorgung mit NO_3^- die apathogenen anaeroben Bakterien einen Selektionsvorteil haben. Einer chronischen Parodontitis wird entgegengewirkt und auf diese Weise auch ein positiver Effekt für die kardiovaskuläre Gesundheit erreicht. Eine Begleitsymptomatik der Parodontitis ist oftmals eine Halitosis, hervorgerufen durch flüchtige Schwefelverbindungen aus dem bakteriellen Stoffwechsel. Nakano et al. (2016) konnten eine Verringerung eben dieser flüchtigen Schwefelverbindungen nach der Einnahme einer Tablette mit Lactoferrin, Lactoperoxidase und Glucose Oxidase nachweisen, was auf eine Beeinflussung des Bakterienstoffwechsels hindeutet. So zeigten Hyde et al. (2014), dass aufgrund einer nitratreichen Ernährung eine Änderung des oralem Microbioms möglich ist. Die Autoren vermuten, dass pathologische Zustände wie chronische Parodontitis und Herz-Kreislaufkrankungen mit dem Rückgang von nitratreduzierenden Bakterien und dem Anstieg von pathologischen Bakterien in Verbindung steht. Doel et al. (2004) vermuten eine karioprotektive Wirkung durch die Anwesenheit von NO_2^- , beziehungsweise von NO_3^- und nitratreduzierenden Bakterien.

Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass Klebanoff (1993) eine Steigerung der Enzymaktivität der Lactoperoxidase unter dem Einfluss von Nitrit feststellte.

Takahama et al. (2006) vermuteten sogar eine eigenständige Reaktion und nannten es das LPO-H₂O₂-Nitrit-System, aus dem reaktive Stickstoffverbindungen hervorgehen. Diese können dann mit den Bakterienzellbestandteilen reagieren und unterbinden auf diese Weise das bakterielle Wachstum.

Der positive Einfluss von NO auf den Organismus ist hinlänglich belegt (Lundberg et al. 2008, Webb et al. 2008, Kapil et al. 2010, Kapil et al. 2010). Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass die symbiotischen oralen Bakterien eine aktive Rolle in der Regulation des Gastrointestinaltraktes, als auch des Herzkreislaufsystems spielen (Petersson et al. 2009), wobei der exakte Mechanismus hinter der Absenkung des Blutdrucks durch die Aufnahme von NO₃⁻ und NO₂⁻ noch nicht völlig verstanden ist (Cosby et al. 2003). Dennoch wäre ein plaquehemmendes Zahnpflegeprodukt, das die NO₃⁻ reduzierenden Bakterien nicht hemmt, als gesundheitsfördernd einzustufen (Hyde et al. 2014).

6 Zusammenfassung

Das Speichelperoxidase-System nimmt in der Gruppe der unspezifischen Abwehr eine besondere Stellung ein, indem es das orale Mikrobiom reguliert. Damit ist das Speichelperoxidase-System eine gute Grundlage für die Entwicklung eines sicheren und wirkungsvollen Mundpflegeproduktes. Die erstmals 1943 aus der Kuhmilch isolierte Lactoperoxidase weist in Struktur und Reaktivität eine hohe Ähnlichkeit zur Speichelperoxidase auf. Beide Peroxidasen vermitteln die Oxidation von Thiocyanat (SCN^-) in das antibakteriell sehr effektive Hypothiocyanit (OSCN^-), wobei Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Sauerstoffdonator fungiert.

Im Rahmen des Verbundforschungsprojekts „Large Protection of Oral Health“ wurden Mundhygienelutschdragees als Ergänzung zur mechanischen Zahnreinigung entwickelt und getestet.

Zur Untersuchung der Wirksamkeit der entwickelten LPO-Dragees wurde eine randomisierte, doppelt verblindete Studie im 4-fach Cross-over Design angewendet. Alle Probanden benutzten zeitlich versetzt zwei Lutschdragees, die LPO und SCN^- mit unterschiedlichen H_2O_2 Gehalten (Dragee B: 0,083 % und Dragee C: 0,04 %) enthielten, ein Placebo-Dragee als Negativkontrolle und eine handelsübliche Mundspüllösung (Listerine[®] Total Care, Johnson & Johnson, Germany) als Positivkontrolle in zufälliger Reihenfolge. Das Placebo und die zwei Lutschdragee-Varianten waren hinsichtlich Aussehen, Geschmack und der Darreichungsform nicht voneinander zu unterscheiden. Zwischen den Anwendungen der verschiedenen Präparate lag eine Wash-out-Phase von jeweils 10 Tagen.

Ziel der Studie war, die Auswirkungen der entwickelten Lutschdragees auf die Plaqueneubildung, *S. mutans*, Lactobacillen und die Gesamtkeimzahl zu untersuchen. Zusätzlich wurden folgende chemische Parameter ionenchromatographisch bestimmt: Thiocyanat (SCN^-), Hypothiocyanit (OSCN^-), Nitrat (NO_3^-) und Nitrit (NO_2^-).

Beide Prüfdragees führten im Vergleich zum Placebo zu einer statistisch signifikanten Hemmung der Plaqueneubildung, die aber unter der der Positivkontrolle lag. Dragee B hatte eine größere statistisch signifikante Hemmung von *S. mutans* gegenüber Dragee C und dem Placebo. Bei den Lactobacillen zeigte das Dragee C eine statistisch signifikant bessere Wirkung als die Positivkontrolle, Dragee B und dem Placebo. Sowohl die Test-Dragees als auch beide Kontrollen hatten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Gesamtkeimzahl.

Im Speichel war ein erhöhter SCN^- Gehalt bei der Anwendung der Prüfdragees festzustellen, was vermutlich mit dem SCN^- Gehalt des Dragees im Zusammenhang steht. Hingegen wurde keine Erhöhung des hochreaktiven OSCN^- zum Zeitpunkt der Messung am 5. Tag beobachtet. Das Nitrat/Nitrit Verhältnis deutet daraufhin, dass die Anzahl der kardiovaskulär positiv einzustufenden nitratreduzierenden Bakterien durch Dragee B statistisch signifikant höher war als bei der Anwendung von Listerine[®].

Insgesamt kann festgestellt werden, dass durch die Anwendung eines Lutschdragees mit den Komponenten des Lactoperoxidase-Systems bezüglich der Hemmung der Plaqueneubildung und der Proliferation von kariogenen Keimen ein Nutzen für den Anwender zu erzielen ist und die gewählte Applikationsform sich gut in Alltag integrieren lässt.

7 Literaturverzeichnis

Aas, J. A., A. L. Griffen, S. R. Dardis, A. M. Lee, I. Olsen, F. E. Dewhirst, E. J. Leys and B. J. Paster (2008). "Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults." J Clin Microbiol **46**(4): 1407-1417.

Adams, S. E., D. Arnold, B. Murphy, P. Carroll, A. K. Green, A. M. Smith, P. D. Marsh, T. Chen, R. E. Marriott and M. G. Brading (2017). "A randomised clinical study to determine the effect of a toothpaste containing enzymes and proteins on plaque oral microbiome ecology." Sci Rep **7**: 43344.

Adamson, M. and K. M. Pruitt (1981). "Lactoperoxidase-catalyzed inactivation of hexokinase." Biochim Biophys Acta **658**(2): 238-247.

Addy, M., P. Renton-Harper and R. Newcombe (1999). "Plaque regrowth studies: discriminatory power of plaque index compared to plaque area." J Clin Periodontol **26**(2): 110-112.

Addy, M., L. Willis and J. Moran (1983). "Effect of toothpaste rinses compared with chlorhexidine on plaque formation during a 4-day period." J Clin Periodontol **10**(1): 89-99.

Adolphe, Y., M. Jacquot, M. Linder, A. M. Revol-Junelles and J. B. Milliere (2006). "Optimization of the components concentrations of the lactoperoxidase system by RSM." J Appl Microbiol **100**(5): 1034-1042.

Afseth, J. and G. Rolla (1983). "Clinical experiments with a toothpaste containing amyloglucosidase and glucose oxidase." Caries Res **17**(5): 472-475.

Alam, S., S. R. Brailsford, S. Adams, C. Allison, E. Sheehy, L. Zoitopoulos, E. A. Kidd and D. Beighton (2000). "Genotypic heterogeneity of *Streptococcus oralis* and distinct aciduric subpopulations in human dental plaque." Appl Environ Microbiol **66**(8): 3330-3336.

Allaker, R. P., L. S. Silva Mendez, J. M. Hardie and N. Benjamin (2001). "Antimicrobial effect of acidified nitrite on periodontal bacteria." Oral Microbiol Immunol **16**(4): 253-256.

Allison, D. G. (2003). "The biofilm matrix." Biofouling **19**(2): 139-150.

Anwar, H. and J. W. Costerton (1990). "Enhanced activity of combination of tobramycin and piperacillin for eradication of sessile biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **34**(9): 1666-1671.

Arnhold, J. and J. Flemmig (2010). "Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity." Arch Biochem Biophys **500**(1): 92-106.

Arnhold, J., E. Monzani, P. G. Furtmuller, M. Zederbauer, L. Casella and C. Obinger (2006). "Kinetics and thermodynamics of halide and nitrite oxidation by mammalian heme peroxidases." Eur J Inorg Chem **2006**(19): 3801-3811.

Ashby, M. T. (2008). "Inorganic chemistry of defensive peroxidases in the human oral cavity." J Dent Res **87**(10): 900-914.

Ashby, M. T. (2012). "Hypothiocyanite." Adv Inorg Chem **64**: 263-303.

- Ashby, M. T., J. Kreth, M. Soundarajan and L. S. Sivuilu (2009). "Influence of a model human defensive peroxidase system on oral streptococcal antagonism." Microbiol-Sgm **155**: 3691-3700.
- Attin, T. and E. Hornecker (2005). "Tooth brushing and oral health: how frequently and when should tooth brushing be performed?" Oral Health Prev Dent **3**(3): 135-140.
- Aune, T. M., E. L. Thomas and M. Morrison (1977). "Lactoperoxidase-catalyzed incorporation of thiocyanate ion into a protein substrate." Biochem **16**(21): 4611-4615.
- Banoczy, J., C. Dombi, A. Czegledly and K. Sari (1994). "A clinical study with lactoperoxidase containing gel and toothpaste in patients with dry mouth syndrome." J Clin Dent **5**: 65-69.
- Barrett, T. J. and C. L. Hawkins (2012). "Hypothiocyanous acid: benign or deadly?" Chem Res Toxicol **25**(2): 263-273.
- Baynton, K. J., J. K. Bewtra, N. Biswas and K. E. Taylor (1994). "Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation." Biochim Biophys Acta **1206**(2): 272-278.
- Below, H., R. Baguhl, W. Gessner, A. Kramer, E. Below, H. Kahlert and A. Welk (2018). "Specific and robust ion chromatographic determination of hypothiocyanite in saliva samples." Anal Bioanal Chem **410**(11): 2739-2749.
- Benjamin, N., F. O'Driscoll, H. Dougall, C. Duncan, L. Smith, M. Golden and H. McKenzie (1994). "Stomach NO synthesis." Nature **368**(6471): 502.
- Caglar, E., S. K. Cildir, S. Ergeneli, N. Sandalli and S. Twetman (2006). "Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets." Acta Odontol Scand **64**(5): 314-318.
- Carlsson, J. (1983). "Catalytic activity of lactoperoxidase in the presence of SCN⁻." Biochem Biophys Res Commun **116**(2): 568-573.
- Carlsson, J. (1987). "Salivary peroxidase: an important part of our defense against oxygen-toxicity." J Oral Pathol Med **16**(8): 412-416.
- Carlsson, J., M.-B. K. Edlund and L. Hånström (1984). "Bactericidal and cyto-toxic effects of hypothiocyanite-hydrogen peroxide mixtures." Infect Immun **44**(3): 581-586.
- Carlsson, J. and M. B. Edlund (1987). "Pyruvate oxidase in *Streptococcus sanguis* under various growth conditions." Oral Microbiol Immunol **2**(1): 10-14.
- Carlsson, J., M. B. Edlund and S. K. Lundmark (1987). "Characteristics of a hydrogen peroxide-forming pyruvate oxidase from *Streptococcus sanguis*." Oral Microbiol Immunol **2**(1): 15-20.
- Carlsson, J., Y. Iwami and T. Yamada (1983). "Hydrogen peroxide excretion by oral streptococci and effect of lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide." Infect Immun **40**: 70-80.
- Carlsson, S., N. P. Wiklund, L. Engstrand, E. Weitzberg and J. O. Lundberg (2001). "Effects of pH, nitrite, and ascorbic acid on nonenzymatic nitric oxide generation and bacterial growth in urine." Nitric Oxide **5**(6): 580-586.

- Ceri, H., M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck and A. Buret (1999). "The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms." J Clin Microbiol **37**(6): 1771-1776.
- Chandler, J. D. and B. J. Day (2012). "Thiocyanate: A potentially useful therapeutic agent with host defense and antioxidant properties." Biochem Pharmacol **84**(11): 1381-1387.
- Chooruk, A., S. Piwat and R. Teanpaisan (2017). "Antioxidant activity of various oral Lactobacillus strains." J Appl Microbiol **123**(1): 271-279.
- Ciandrini, E., R. Campana, L. Casettari, D. R. Perinelli, L. Fagioli, A. Manti, G. F. Palmieri, S. Papa and W. Baffone (2016). "Characterization of biosurfactants produced by Lactobacillus spp. and their activity against oral streptococci biofilm." Appl Microbiol Biotechnol **100**(15): 6767-6777.
- Clifford, D. P. and J. E. Repine (1982). "Hydrogen peroxide mediated killing of bacteria." Mol Cell Biochem **49**(3): 143-149.
- Colby, S. M. and R. R. B. Russell (1997). "Sugar metabolism by mutans streptococci." J Appl Microbiol **83**(S1): 80S-88S.
- Cosby, K., K. S. Partovi, J. H. Crawford, R. P. Patel, C. D. Reiter, S. Martyr, B. K. Yang, M. A. Waclawiw, G. Zalos, X. Xu, K. T. Huang, H. Shields, D. B. Kim-Shapiro, A. N. Schechter, R. O. Cannon, 3rd and M. T. Gladwin (2003). "Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation." Nat Med **9**(12): 1498-1505.
- Cosseau, C., D. A. Devine, E. Dullaghan, J. L. Gardy, A. Chikatamarla, S. Gellatly, L. L. Yu, J. Pistollic, R. Falsafi, J. Tagg and R. E. Hancock (2008). "The commensal Streptococcus salivarius K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis." Infect Immun **76**(9): 4163-4175.
- Das, D., P. K. De and R. K. Banerjee (1995). "Thiocyanate, a plausible physiological electron donor of gastric peroxidase." Biochem J **305**(1): 59-64.
- Davies, M. J., C. L. Hawkins, D. I. Pattison and M. D. Rees (2008). "Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications." Antioxid Redox Signal **10**(7): 1199-1234.
- DeMuth, R., M. Adamson and K. Pruitt (1981). "Streptococcus mutans spontaneous recovery from hypothiocyanite inhibition – a theoretical analysis." J Dent Res (Special Issue A) **60**: 444.
- DIN EN ISO 6222 (1999). "Wasserbeschaffenheit, Quantitative Bestimmung der kultivierbaren Mikroorganismen, Bestimmung der Koloniezahl durch Einimpfen in ein Nährmedium." Berlin, Beuth Verlag.
- Doel, J. J., N. Benjamin, M. P. Hector, M. Rogers and R. P. Allaker (2005). "Evaluation of bacterial nitrate reduction in the human oral cavity." Eur J Oral Sci **113**(1): 14-19.
- Doel, J. J., M. P. Hector, C. V. Amirtham, L. A. Al-Anzan, N. Benjamin and R. P. Allaker (2004). "Protective effect of salivary nitrate and microbial nitrate reductase activity against caries." Eur J Oral Sci **112**(5): 424-428.
- Dua, S., M. J. Maclean, M. Fitzgerald, A. M. McAnoy and J. H. Bowie (2006). "Is the hypothiocyanite anion (OSCN)⁻ the major product in the peroxidase catalyzed oxidation of

- the thiocyanate anion (SCN)⁻? A joint experimental and theoretical study." J Phy Chem A **110**(14): 4930-4936.
- Fischer, A. J., N. J. Lennemann, S. Krishnamurthy, P. Pocza, L. Durairaj, J. L. Launspach, B. A. Rhein, C. Wohlford-Lenane, D. Lorentzen, B. Banfi and P. B. McCray, Jr. (2011). "Enhancement of respiratory mucosal antiviral defenses by the oxidation of iodide." Am J Respir Cell Mol Biol **45**(4): 874-881.
- Flemmig, J., J. Gau, D. Schlorke and J. Arnhold (2016). "Lactoperoxidase as a potential drug target." Expert Opin Ther Targets **20**(4): 447-461.
- Flemmig, T. F. and T. Beikler (2011). "Control of oral biofilms." Periodontol 2000 **55**(1): 9-15.
- Fragoso, M. A., V. Fernandez, R. Forteza, S. H. Randell, M. Salathe and G. E. Conner (2004). "Transcellular thiocyanate transport by human airway epithelia." J Physiol **561**(1): 183-194.
- Fujiwara, T., M. Tamesada, Z. Bian, S. Kawabata, S. Kimura and S. Hamada (1996). "Deletion and reintroduction of glucosyltransferase genes of *Streptococcus mutans* and role of their gene products in sucrose dependent cellular adherence." Microb Pathog **20**(4): 225-233.
- Furtmuller, P. G., W. Jantschko, G. Regelsberger, C. Jakopitsch, J. Arnhold and C. Obinger (2002). "Reaction of lactoperoxidase compound I with halides and thiocyanate." Biochemistry **41**(39): 11895-11900.
- Garcia-Mendoza, A., J. Liebana, A. M. Castillo, A. de la Higuera and G. Piedrola (1993). "Evaluation of the capacity of oral streptococci to produce hydrogen peroxide." J Med Microbiol **39**(6): 434-439.
- Geiszt, M., J. Witta, J. Baffi, K. Lekstrom and T. L. Leto (2003). "Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense." Faseb J **17**(9): 1502-1504.
- Gelman, A. and J. Hill (2007). Linear regression: before and after fitting the model. In: Data analysis using regression and multilevel/hierarchical models. Cambridge, Cambridge University Press: 53-77.
- Germaine, G. R. and L. M. Tellefson (1981). "Effect of human saliva on glucose uptake by *Streptococcus mutans* and other oral microorganisms." Infect Immun **31**(2): 598-607.
- Gilbert, P., J. Das and I. Foley (1997). "Biofilm susceptibility to antimicrobials." Adv Dent Res **11**(1): 160-167.
- Gilbert, P., T. Maira-Litran, A. J. McBain, A. H. Rickard and F. W. Whyte (2002). "The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities." Adv Microb Physiol **46**: 202-256.
- Goi, N., K. Takagi, Y. Hirai, H. Harada, A. Kari, Y. Terashima, N. Kinae, M. Hiramatsu, K. Nakamura and T. Ono (2007). "Effect of psychologic stress on peroxidase and thiocyanate levels in human saliva detected by ultraweak chemiluminescence." J Health Sci **2**: 161-169.
- Gould, N. S., S. Gauthier, C. T. Kariya, E. Min, J. Huang and D. J. Brian (2010). "Hypertonic saline increases lung epithelial lining fluid glutathione and thiocyanate: two protective CFTR-dependent thiols against oxidative injury." Respir Res **11**: 119.

- Greenland, S. (2009). Introduction to regression models. In: Modern epidemiology. K. J. Rothman, S. Greenland and T. L. Lash. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 381-417.
- Han, H. and H. Kwon (2009). "Estimated dietary intake of thiocyanate from brassicaceae family in Korean diet." J Toxicol Environ Health A **72**(21-22): 1380-1387.
- Hannig, C., J. Hoch, K. Becker, M. Hannig and T. Attin (2005). "Lysozyme activity in the initially formed in situ pellicle." Arch Oral Biol **50**(9): 821-828.
- Hannig, C., B. Spitzmüller, S. Knausenberger, W. Hoth-Hannig, E. Hellwig and M. Hannig (2008). "Detection and activity of peroxidase in the in situ formed enamel pellicle." Arch Oral Biol **53**(9): 849-858.
- Hannig, M. and M. Balz (1999). "Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion." Caries Res **33**(5): 372-379.
- Hawkins, C. L. (2009). "The role of hypothiocyanous acid (HOSCN) in biological systems." Free Radic Res **43**(12): 1147-1158.
- Headon, D. R. (2000). Human lactoferrin: production at large scale, characterization and applications. In: Lactoferrin: structure, function and applications. K. Shimazaki, H. Tsuda, M. Tomita, T. Kuwata and J.-P. Perraudin. Amsterdam, Elsevier Science: 415-427.
- Hellwig, E., J. Klimek and T. Attin (2013). Ätiologie, Histologie und Epidemiologie der Karies und anderer Zahnhartsubstanzdefekte. In: Einführung in die Zahnerhaltung. München, Urban und Fischer: 27-31.
- Hogg, D. M. and G. R. Jago (1970). "The antibacterial action of lactoperoxidase. The nature of the bacterial inhibitor." Biochem J **117**(4): 779-790.
- Holiday, D. B., J. W. McLarty, R. H. Yanagihara, L. Riley and S. B. Shepherd (1995). "Two biochemical markers effectively used to separate smokeless tobacco users from smokers and nonusers." South Med J **88**(11): 1107-1113.
- Hoogendoorn, H., J. P. Piessens, W. Scholtes and L. A. Stoddard (1977). "Hypothiocyanite ion; the inhibitor formed by the system lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. I. Identification of the inhibiting compound." Caries Res **11**(2): 77-84.
- Horn, F. (2009). Das Immunsystem. In: Biochemie des Menschen. M. Armbruster, S. Berghold, F. Blaeschke, C. Grillhösl, S. Helferich, I. Moc, M. Pritsch, N. Schneider and P. Ziegler. Stuttgart, Georg Thieme: 594.
- Hugoson, A., G. Koch, H. Thilander and H. Hoogendoorn (1974). "Lactoperoxidase in the prevention of plaque accumulation, gingivitis and dental caries. 3. Effect of mouthrinses with amyloglucosidase and glucoseoxidase in the model system of experimental gingivitis and caries in man." Odontol Revy **25**(1): 69-80.
- Hyde, E. R., B. Luk, S. Cron, L. Kusic, T. McCue, T. Bauch, H. Kaplan, G. Tribble, J. F. Petrosino and N. S. Bryan (2014). "Characterization of the rat oral microbiome and the effects of dietary nitrate." Free Radic Biol Med **77**: 249-257.
- Ihalin, R., V. Loimaranta, M. Lenander-Lumikari and J. Tenovuo (2001). "The sensitivity of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* to different (pseudo)halide-peroxidase combinations compared with mutans streptococci." J Med Microbiol **50**(1): 42-48.

- Ihalin, R., V. Loimaranta and J. Tenovuo (2006). "Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva." Arch Biochem Biophys **445**(2): 261-268.
- Jahr, H., S. Kiowski and R. von Baehr (1986). "Activation of human granulocytes and monocytes by physiologic concentrations of thiocyanate (rhodanide)." Allerg Immunol (Leipz) **32**(4): 271-275.
- Jenzer, H., W. Jones and H. Kohler (1986). "On the Molecular Mechanism of Lactoperoxidase-Catalyzed H₂O₂ Metabolism and Irreversible Enzyme Inactivation." Journal of Biological Chemistry **261**(33): 5550-5556.
- Jenzer, H. and H. Kohler (1986). "The role of superoxide radicals in lactoperoxidase-catalyzed H₂O₂-metabolism and in irreversible enzyme inactivation." Biochemical and Biophysical Research Communications **139**(1): 327-332.
- Johnson, S. A., P. A. Goddard, C. Iliffe, B. Timmins, A. H. Rickard, G. Robson and P. S. Handley (2002). "Comparative susceptibility of resident and transient hand bacteria to para-chloro-meta-xyleneol and triclosan." J Appl Microbiol **93**(2): 336-344.
- Jones, B. and M. G. Kenward (2015). Analysis of continuous data. In: Design and analysis of cross-over trials. Boca Raton, CRC Press: 187-279.
- Kalmar, J., K. L. Woldegiorgis, B. Biri and M. T. Ashby (2011). "Mechanism of decomposition of the human defense factor hypothiocyanite near physiological pH." J Am Chem Soc **133**(49): 19911-19921.
- Kapil, V., A. B. Milsom, M. Okorie, S. Maleki-Toyserkani, F. Akram, F. Rehman, S. Arghandawi, V. Pearl, N. Benjamin, S. Loukogeorgakis, R. Macallister, A. J. Hobbs, A. J. Webb and A. Ahluwalia (2010). "Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO." Hypertension **56**(2): 274-281.
- Kapil, V., A. J. Webb and A. Ahluwalia (2010). "Inorganic nitrate and the cardiovascular system." Heart **96**(21): 1703-1709.
- Kersten, H. W., W. R. Moorer and R. Wever (1981). "Thiocyanate as a cofactor in myeloperoxidase activity against *Streptococcus mutans*." J Dent Res **60**(4): 831-837.
- Kielbassa, A., S. Shohadai and J. Schulte-Mönting (2000). "Effect of saliva substitutes on mineral content of demineralised and sound dental enamel." Support Care Cancer **9**: 40-47.
- Kinniment, S. L., J. W. Wimpenny, D. Adams and P. D. Marsh (1996). "The effect of chlorhexidine on defined, mixed culture oral biofilms grown in a novel model system." J Appl Bacteriol **81**(2): 120-125.
- Kirk, A. B., J. V. Dyke, C. F. Martin and P. K. Dasgupta (2007). "Temporal patterns in perchlorate, thiocyanate, and iodide excretion in human milk." Environ Health Perspect **115**(2): 182-186.
- Kirstilä, V., M. Lenander-Lumikari and J. Tenovuo (1994). "Effects of a lactoperoxidase-system-containing toothpaste on dental plaque and whole saliva in vivo." Acta Odontol Scand **52**(6): 346-353.
- Klebanoff, S. J. (1993). "Reactive nitrogen intermediates and antimicrobial activity: role of nitrite." Free Radic Biol Med **14**(4): 351-360.

- Kneist, S. and A. Callaway (2013). "Von Generalisten und Spezialisten: Die Rolle der Bakterien in der erweiterten ökologischen Plaquehypothese." ZMK **29**(9): 548-556.
- Knight, T. M., D. Forman, S. A. Al-Dabbagh and R. Doll (1987). "Estimation of dietary intake of nitrate and nitrite in Great Britain." Food Chem Toxicol **25**(4): 277-285.
- Koch, G., K. Edlund and H. Hoogendoorn (1973). "Lactoperoxidase in the prevention of plaque accumulation, gingivitis and dental caries. II. Effect of mouthrinses with amyloglucosidase and glucoseoxidase on plaque accumulation on teeth in individuals on a sucrose diet." Odontol Revy **24**(4): 367-372.
- Koch, G. and G. Strand (1979). "Effect of an enzyme dentifrice on caries. A two-year clinical pilot study." Swed Dent J **3**(1): 9-13.
- Korpela, A., X. Yu, V. Loimaranta, M. Lenander-Lumikari, A. Vacca-Smith, D. Wunder, W. H. Bowen and J. Tenovuo (2002). "Lactoperoxidase inhibits glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* in vitro." Caries Res **36**(2): 116-121.
- Kramer, A. and H. Böhland (1996). "Biological, medical and chemical aspects of thiocyanate research." Hygiene und Medizin **21**: 335-345.
- Kramer, A., F. A. Pitten and H. Zöllner (1998). "Einfluß von Thiocyanat auf die Schilddrüse in Hinblick auf Empfehlungen für eine thiocyanatreiche Ernährung." Dtsch Lebensmitt Rundsch **1**: 83-88.
- Kraus, F. W., J. F. Nickerson, W. I. Perry and A. P. Walker (1957). "Peroxide and peroxidogenic bacteria in human saliva." J Bacteriol **73**(6): 727-735.
- Kreth, J., Y. Zhang and M. C. Herzberg (2008). "Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*." J Bacteriol **190**(13): 4632-4640.
- Kreth, J., L. Zhu, J. Merritt, W. Shi and F. Qi (2008). "Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*." Oral Microbiol Immunol **23**(3): 213-219.
- Kuramitsu, H. K. (1993). "Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics." Crit Rev Oral Biol Med **4**(2): 159-176.
- Larsen, T. (2002). "Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole." Oral Microbiol Immunol **17**(5): 267-271.
- Larsen, T. and N. E. Fiehn (1996). "Resistance of *Streptococcus sanguis* biofilms to antimicrobial agents." APMIS **104**(4): 280-284.
- Lenander-Lumikari, M., J. Tenovuo and H. Mikola (1993). "Effects of lactoperoxidase system-containing toothpaste on levels of hypothiocyanite and bacteria in saliva." Caries Res **27**: 285-291.
- Lendenmann, U., J. Grogan and F. G. Oppenheim (2000). "Saliva and dental pellicle - a review." Adv Dent Res **14**: 22-28.
- Leto, T. L. and M. Geiszt (2006). "Role of Nox family NADPH oxidases in host defense." Antioxid Redox Signal **8**(9-10): 1549-1561.

- Leung, A. M., A. Lamar, X. He, L. E. Braverman and E. N. Pearce (2011). "Iodine status and thyroid function of boston-area vegetarians and vegans." J Clin Endocrinol Metab **96**(8): E1303-1307.
- Li, Y. H., N. Tang, M. B. Aspiras, P. C. Lau, J. H. Lee, R. P. Ellen and D. G. Cvitkovitch (2002). "A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation." J Bacteriol **184**(10): 2699-2708.
- Liu, L., H. Tong and X. Dong (2012). "Function of the pyruvate oxidase-lactate oxidase cascade in interspecies competition between *Streptococcus oligofermentans* and *Streptococcus mutans*." Appl Environ Microbiol **78**(7): 2120-2127.
- Loesche, W. J. (1986). "Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay." Microbiol Rev **50**(4): 353-380.
- Lorentzen, D., L. Durairaj, A. A. Pezzulo, Y. Nakano, J. Launspach, D. A. Stoltz, G. Zamba, P. B. McCray, Jr., J. Zabner, M. J. Welsh, W. M. Nauseef and B. Banfi (2011). "Concentration of the antibacterial precursor thiocyanate in cystic fibrosis airway secretions." Free Radic Biol Med **50**(9): 1144-1150.
- Lucas, V. S., D. Beighton and G. J. Roberts (2000). "Composition of the oral streptococcal flora in healthy children." J Dent **28**(1): 45-50.
- Lumikari, M. and J. Tenovuo (1991). "Effects of lysozyme thiocyanate combinations on the viability and lactic-acid production of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus rattus*." Acta Odontol Scand **49**(3): 175-181.
- Lundberg, J. O., E. Weitzberg, J. A. Cole and N. Benjamin (2004). "Nitrate, bacteria and human health." Nat Rev Microbiol **2**(7): 593-602.
- Lundberg, J. O., E. Weitzberg and M. T. Gladwin (2008). "The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics." Nat Rev Drug Discov **7**(2): 156-167.
- Mahdi, L., H. MUSAFAER, L. Zwain, I. Salman, I. Al-Joofy, K. Rasool, A. Mussa, S. Al-Kakei, R. Al-Oqaili, S. Al-Alak, A. Chalooob, A. Abdulkareem, B. Hussein, N. Mahdi and N. Taher (2017). "Two novel roles of buffalo milk lactoperoxidase, antibiofilm agent and immunomodulator against multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi and *Listeria monocytogenes*." Microb Pathog **109**: 221-227.
- Mansson-Rahemtulla, B., F. Rahemtulla, D. C. Baldone, K. M. Pruitt and A. Hjerpe (1988). "Purification and characterization of human salivary peroxidase." Biochemistry **27**(1): 233-239.
- Mansson-Rahemtulla, B., F. Rahemtulla and M. G. Humphreys-Beher (1990). "Human salivary peroxidase and bovine lactoperoxidase are cross-reactive." J Dent Res **69**(12): 1839-1846.
- Mansson-Rahemtulla, B., T. Techanitwad, F. Rahemtulla, T. O. Mcmillan, E. L. Bradley, Y. B. Wahlin and K. Kaen (1992). "Analyses of salivary components in leukemia patients receiving chemotherapy." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **73**(1): 35-46.
- Marsh, P. D. (1989). "Host defenses and microbial homeostasis: role of microbial interactions." J Dent Res **68**: 1567-1575.

- Marsh, P. D. (2003). "Are dental diseases examples of ecological catastrophes?" Microbiology **149**(2): 279-294.
- Marsh, P. D. (2005). "Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style." J Clin Periodontol **32**(s6): 7-15.
- Marsh, P. D. (2012). "Contemporary perspective on plaque control." Br Dent J **212**(12): 601-606.
- Marsh, P. D. and D. J. Bradshaw (1993). "Microbiological effects of new agents in dentifrices for plaque control." Int Dent J **43**(4 Suppl 1): 399-406.
- Mendi, A. and B. Aslim (2014). "Antioxidant lactobacilli could protect gingival fibroblasts against hydrogen peroxide: a preliminary in vitro study." Probiotics Antimicrob Proteins **6**(3-4): 157-164.
- Mickelson, M. N. (1977). "Glucose transport in *Streptococcus agalactiae* and its inhibition by lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide." J Bacteriol **132**(2): 541-548.
- Midda, M. and M. W. Cooksey (1986). "Clinical uses of an enzyme-containing dentifrice." J Clin Periodontol **13**(10): 950-956.
- Millward, T. A. and M. Wilson (1989). "The effect of chlorhexidine on *Streptococcus sanguis* biofilms." Microbios **58**(236-237): 155-164.
- Minarowski, L., D. Sands, A. Minarowska, A. Karwowska, A. Sulewska, M. Gacko and E. Chyczewska (2008). "Thiocyanate concentration in saliva of cystic fibrosis patients." Folia Histochem Cytobiol **46**(2): 245-246.
- Momeni, S. S., J. Whiddon, K. Cheon, T. Ghazal, S. A. Moser and N. K. Childers (2016). "Genetic diversity and evidence for transmission of *Streptococcus mutans* by DiversiLab rep-PCR." J Microbiol Methods **128**: 108-117.
- Moran, J. and M. Addy (1984). "The antibacterial properties of some commercially available toothpastes in vitro." Br Dent J **156**(5): 175-178.
- Moran, J., M. Addy and R. Newcombe (1988). "The antibacterial effect of toothpastes on the salivary flora." J Clin Periodontol **15**(3): 193-199.
- Morgan, T. D. B., G. Stedman and P. A. E. Whincup (1965). "The ionisation constant of thiocyanic acid." J Chem Soc **0**: 4813-4822.
- Morrison, M. and G. R. Schonbaum (1976). "Peroxidase-catalyzed halogenation." Annu Rev Biochem **45**: 861-888.
- Mulligan, R., M. Navazesh and J. Slots (1992). "Antibacterial activity of an alcohol-free mouthwash with enzymes." J Dent Res **71**(Special Issue): 156 (Abstract).
- Munro, C., S. M. Michalek and F. L. Macrina (1991). "Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange." Infect Immun **59**(7): 2316-2323.
- Nagahara, N., T. Okazaki and T. Nishino (1995). "Cytosolic mercaptopyruvate sulfurtransferase is evolutionarily related to mitochondrial rhodanese. Striking similarity in

active site amino acid sequence and the increase in the mercaptopyruvate sulfurtransferase activity of rhodanese by site-directed mutagenesis." J Biol Chem **270**(27): 16230-16235.

Nagler, R. M., I. Klein, N. Zarzhevsky, N. Drigues and A. Z. Reznick (2002). "Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva." Free Radic Biol Med **32**(3): 268-277.

Nagy, P., G. N. Jameson and C. C. Winterbourn (2009). "Kinetics and mechanisms of the reaction of hypothiocyanous acid with 5-thio-2-nitrobenzoic acid and reduced glutathione." Chem Res Toxicol **22**(11): 1833-1840.

Nagy, P., X. Wang, K. Lemma and M. T. Ashby (2007). "Reactive sulfur species: hydrolysis of hypothiocyanite to give thiocarbamate-S-oxide." J Am Chem Soc **129**(51): 15756-15757.

Nakano, M., E. Shimizu, H. Wakabayashi, K. Yamauchi and F. Abe (2016). "A randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled clinical trial to assess effects of the single ingestion of a tablet containing lactoferrin, lactoperoxidase, and glucose oxidase on oral malodor." BMC Oral Health **16**: 37.

Newcombe, R. G., M. Addy and S. McKeown (1995). "Residual effect of chlorhexidine gluconate in 4-day plaque regrowth crossover trials, and its implications for study design." J Periodontal Res **30**(5): 319-324.

Nichols, W. W. (1994). Biofilm permeability to antibacterial agents. In: Bacterial biofilms and their control in medicine and industry. J. Wimpenny, W. Nichols, D. Stickler and H. Lappin-Scott. Cardiff, BioLine: 141-149.

Noiri, Y., Y. Okami, M. Narimatsu, Y. Takahashi, T. Kawahara and S. Ebisu (2003). "Effects of chlorhexidine, minocycline, and metronidazole on Porphyromonas gingivalis strain 381 in biofilms." J Periodontol **74**(11): 1647-1651.

Ozmeric, N. (2004). "Advances in periodontal disease markers." Clin Chim Acta **343**(1-2): 1-16.

Paetzelt, H., A. Kramer and K.-H. Lüdde (1984). "Die biologische Bedeutung der Lactoperoxidase-H₂O₂-Thiocyanatsysteme." Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Greifswald, Med Reihe **33**(2): 12-13.

Panaro, M. A., O. Brandonisio, A. Acquafredda, M. Sisto and V. Mitolo (2003). "Evidences for iNOS expression and nitric oxide production in the human macrophages." Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord **3**(3): 210-221.

Petersson, J., M. Carlstrom, O. Schreiber, M. Phillipson, G. Christoffersson, A. Jagare, S. Roos, E. A. Jansson, A. E. Persson, J. O. Lundberg and L. Holm (2009). "Gastroprotective and blood pressure lowering effects of dietary nitrate are abolished by an antiseptic mouthwash." Free Radic Biol Med **46**(8): 1068-1075.

Pollock, J. J., H. Goodman, P. K. Elsey and V. J. Iacono (1983). "Synergism of lysozyme, proteases and inorganic monovalent anions in the bacteriolysis of oral Streptococcus mutans GS5." Arch Oral Biol **28**(9): 865-871.

Pollock, J. J., L. I. Katona, H. Goodman, M. I. Cho and V. J. Iacono (1981). "Bacteriolysis of Streptococcus mutans BHT by lysozyme and inorganic anions normally present in human saliva." Arch Oral Biol **26**(9): 711-716.

- Pratten, J. and M. Wilson (1999). "Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose." Antimicrob Agents Chemother **43**(7): 1595-1599.
- Pruitt, K. M. (1987). "The salivary peroxidase system: thermodynamic, kinetic and antibacterial properties." J Oral Pathol **16**(8): 417-420.
- Pruitt, K. M. and M. Adamson (1977). "Enzyme activity of salivary lactoperoxidase adsorbed to human enamel." Infect Immun **17**(1): 112-116.
- Pruitt, K. M., M. Adamson and R. Arnold (1979). "Lactoperoxidase binding to streptococci." Infect Immun **25**(1): 304-309.
- Pruitt, K. M., B. Mansson-Rahemtulla and J. Tenovuo (1983). "Detection of the hypothiocyanite (OSCN) ion in human parotid saliva and the effect of pH on OSCN generation in the salivary peroxidase antimicrobial system." Archs oral Biol **28**(6): 517-525.
- Pruitt, K. M. and B. Reiter (1985). Biochemistry of peroxidase system: antimicrobial effects. In: The Lactoperoxidase system, chemistry and biological significance. New York, Marcel Dekker Inc.: 143-178.
- Pruitt, K. M., J. Tenovuo, R. W. Andrews and T. McKane (1982). "Lactoperoxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate: polarographic study of the oxidation products." Biochemistry **21**: 562-567.
- Pruitt, K. M., J. Tenovuo, W. Fleming and M. Adamson (1982). "Limiting factors for the generation of hypothiocyanite ion, an antimicrobial agent, in human saliva." Caries Res **16**(4): 315-323.
- Pruitt, K. M., J. Tenovuo, B. Mansson-Rahemtulla, P. Harrington and D. C. Baldone (1986). "Is thiocyanate peroxidation at equilibrium in vivo." Biochim Biophys Acta **870**: 385-391.
- Pruitt, K. M., J. O. Tenovuo, B. Mansson-Rahemtulla and P. G. Harrington (1984). "Properties of the antibacterial agent hypothiocyanous acid (HOSCN)." Biochemistry **23**(14): 3376.
- Quigley, G. A. and J. W. Hein (1962). "Comparative cleansing efficiency of manual and power brushing." J Am Dent Assoc **65**: 26-29.
- Ranke, B. and E. Ranke (1971). "Studies on the cariogenicity of extracellular polysaccharides forming streptococci from human tooth plaque." Dtsch Zahnarztl Z **26**(1): 29-36.
- Redanz, S., X. Cheng, R. A. Giacaman, C. S. Pfeifer, J. Merritt and J. Kreth (2018). "Live and let die: Hydrogen peroxide production by the commensal flora and its role in maintaining a symbiotic microbiome." Mol Oral Microbiol.
- Rosin, M., T. Kocher and A. Kramer (2001). "Effects of SCN⁻/H₂O₂ combinations in dentifrices on plaque and gingivitis." J Clin Periodontol **28**(3): 270-276.
- Rosin, M., A. Kramer, D. Bradtke, G. Richter and T. Kocher (2002). "The effect of a SCN⁻/H₂O₂ toothpaste compared to a commercially available triclosan-containing toothpaste on oral hygiene and gingival health - a 6-month home-use study." J Clin Periodontol **29**(12): 1086-1091.

- Rotgans, J. and H. Hoogendoorn (1979). "The effect of brushing with a toothpaste containing amyloglucosidase and glucose oxidase on dental caries in rats." Caries Res **13**(3): 150-153.
- Rudney, J. D., M. A. Krig, E. K. Neuvar, A. H. Soberay and L. Iverson (1991). "Antimicrobial proteins in human unstimulated whole saliva in relation to each other, and to measures of health status, dental plaque accumulation and composition." Arch Oral Biol **36**(7): 497-506.
- Salli, K. M., S. D. Forssten, S. J. Lahtinen and A. C. Ouwehand (2016). "Influence of sucrose and xylitol on an early *Streptococcus mutans* biofilm in a dental simulator." Arch Oral Biol **70**: 39-46.
- Sansone, C., J. Van Houte, K. Joshipura, R. Kent and H. C. Margolis (1993). "The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces." J Dent Res **72**(2): 508-516.
- Scanlon, C. E., B. Berger, G. Malcom and R. W. Wissler (1996). "Evidence for more extensive deposits of epitopes of oxidized low density lipoprotein in aortas of young people with elevated serum thiocyanate levels. PDAY Research Group." Atherosclerosis **121**(1): 23-33.
- Schilling, K. M. and W. H. Bowen (1992). "Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*." Infect Immun **60**(1): 284-295.
- Schlorke, D., J. Flemmig, C. Birkemeyer and J. Arnhold (2016). "Der Schlüssel zum Erfolg. Erst durch Headspace-GC-MS bestätigt: ICN wird durch Lactoperoxidase gebildet." Shimadzu News(1): 6-7.
- Schmidt, D. and J. Morenz (1985). "[Effect of drugs on granulocyte motility]." Allerg Immunol (Leipz) **31**(2): 67-78.
- Schoenfeld, S., J. Stamm, L. Meskin and L. Silverstone (1983). "The effect of an enzyme-containing dentifrice on plaque and gingivitis." J Dent Res **62**: 178 (Abstract).
- Schultz, C. P., M. K. Ahmed, C. Dawes and H. H. Mantsch (1996). "Thiocyanate levels in human saliva: quantitation by Fourier transform infrared spectroscopy." Anal Biochem **240**(1): 7-12.
- Schulz, V. (1984). "Clinical pharmacokinetics of nitroprusside, cyanide, thiosulphate and thiocyanate." Clin Pharmacokinet **9**(3): 239-251.
- Senn, S. (2002). The AB/BA design with normal data. In: Cross-over trials in clinical research. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.: 35-88.
- Shani, S., M. Friedman and D. Steinberg (2000). "The anticariogenic effect of amine fluorides on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase in biofilms." Caries Res **34**(3): 260-267.
- Sharma, S., A. K. Singh, S. Kaushik, M. Sinha, R. P. Singh, P. Sharma, H. Sirohi, P. Kaur and T. P. Singh (2013). "Lactoperoxidase: structural insights into the function, ligand binding and inhibition." Int J Biochem Mol Biol **4**(3): 108-128.
- Singh, P. K., M. R. Parsek, E. P. Greenberg and M. J. Welsh (2002). "A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development." Nature **417**(6888): 552-555.

- Singh, P. K., H. V. Sirohi, N. Iqbal, P. Tiwari, P. Kaur, S. Sharma and T. P. Singh (2017). "Structure of bovine lactoperoxidase with a partially linked heme moiety at 1.98Å resolution." Biochim Biophys Acta **1865**(3): 329-335.
- Skaff, O., D. I. Pattison and M. J. Davies (2009). "Hypothiocyanous acid reactivity with low-molecular-mass and protein thiols: absolute rate constants and assessment of biological relevance." Biochem J **422**: 111-117.
- Skaff, O., D. I. Pattison, P. E. Morgan, R. Bachana, V. K. Jain, K. I. Priyadarsini and M. J. Davies (2012). "Selenium-containing amino acids are targets for myeloperoxidase-derived hypothiocyanous acid: determination of absolute rate constants and implications for biological damage." Biochem J **441**(1): 305-316.
- Socransky, S. S. and A. D. Haffajee (2002). "Dental biofilms: difficult therapeutic targets." Periodontol 2000 **28**: 12-55.
- Söderling, E. M., T. C. Ekman and T. J. Taipale (2008). "Growth inhibition of *Streptococcus mutans* with low xylitol concentrations." Curr Microbiol **56**(4): 382-385.
- Söderling, E. M. and A. M. Hietala-Lenkkeri (2010). "Xylitol and erythritol decrease adherence of polysaccharide-producing oral streptococci." Curr Microbiol **60**(1): 25-29.
- Söderling, E. M., A. M. Marttinen and A. L. Haukioja (2011). "Probiotic lactobacilli interfere with *Streptococcus mutans* biofilm formation in vitro." Curr Microbiol **62**(2): 618-622.
- Spiegelhalder, B., G. Eisenbrand and R. Preussmann (1976). "Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds." Food Cosmet Toxicol **14**(6): 545-548.
- Srinivasan, N. (2010). "Telling apart friend from foe: discriminating between commensals and pathogens at mucosal sites." Innate Immun **16**(6): 391-404.
- Stewart, P. S., J. Rayner, F. Roe and W. M. Rees (2001). "Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates." J Appl Microbiol **91**(3): 525-532.
- Strus, M., M. Brzychczy-Wloch, T. Gosiewski, P. Kochan and P. B. Heczko (2006). "The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities." FEMS Immunol Med Microbiol **48**(1): 56-63.
- Suomalainen, K., L. Saxen, P. Vilja and J. Tenovuo (1996). "Peroxidases, lactoferrin and lysozyme in peripheral blood neutrophils, gingival crevicular fluid and whole saliva of patients with localized juvenile periodontitis." Oral Dis **2**(2): 129-134.
- Takahama, U., S. Hirota and T. Oniki (2006). "Thiocyanate cannot inhibit the formation of reactive nitrogen species in the human oral cavity in the presence of high concentrations of nitrite: detection of reactive nitrogen species with 4,5-diaminofluorescein." Chem Res Toxicol **19**(8): 1066-1073.
- Takahashi, N. and B. Nyvad (2008). "Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process." Caries Res **42**(6): 409-418.
- Tenovuo, J. (2002). "Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety." Oral Dis **8**(1): 23-29.

- Tenovuo, J. and T. Anttonen (1980). "Peroxidase-catalyzed hypothiocyanite production in human salivary sediment in relation to oral health." Caries Res **14**(5): 269-275.
- Tenovuo, J. and T. Anttonen (1980). "Peroxidase-catalyzed hypothiocyanite production in relation to oral health." Caries Res **14**(3): 156-156.
- Tenovuo, J. and M. L. E. Knuutila (1977). "Antibacterial action of various components of lactoperoxidase system on a cariogenic strain of *Streptococcus mutans*." J Dent Res **56**(12): 1603-1607.
- Tenovuo, J., M. Lumikari and T. Soukka (1991). "Salivary lysozyme, lactoferrin and peroxidases: antibacterial effects on cariogenic bacteria and clinical applications in preventive dentistry." Proc Finn Dent Soc **87**(2): 197-208.
- Tenovuo, J. and K. K. Makinen (1976). "Concentration of thiocyanate and ionizable iodine in saliva of smokers and nonsmokers." J Dent Res **55**(4): 661-663.
- Tenovuo, J., B. Mansson-Rahemtulla, K. M. Pruitt and R. Arnold (1981). "Inhibition of dental plaque acid production by the salivary lactoperoxidase antimicrobial system." Infect Immun **34**(1): 208-214.
- Tenovuo, J. and K. M. Pruitt (1984). "Relationship of the human salivary peroxidase system to oral health." J Oral Pathol Med **13**(6): 573-584.
- Tenovuo, J., K. M. Pruitt and E. L. Thomas (1982). "Peroxidase antimicrobial system of human saliva: hypothiocyanite levels in resting and stimulated saliva." J Dent Res **61**(8): 982-985.
- Tenovuo, J., J. Valtakoski and M. L. Knuutila (1977). "Antibacterial activity of lactoperoxidase adsorbed by human salivary sediment and hydroxyapatite." Caries Res **11**(5): 257-262.
- Theorell, H. and A. Akesson (1943). "Highly purified milk peroxidase." Ark Kemi Mineral Geol **17B**(7).
- Thomas, E. (1985). Products of lactoperoxidase-catalysed oxidation of thiocyanate and halides. In: The lactoperoxidase system, chemistry and biological significance. K. M. Pruitt and J. O. Tenovuo. New York, Marcel Dekke Inc.: 31-53.
- Thomas, E. L. (1981). "Lactoperoxidase-catalysed oxidation of thiocyanate: equilibria between oxidized forms of thiocyanate." Biochemistry **20**: 3273-3280.
- Thomas, E. L. and T. M. Aune (1978). "Lactoperoxidase, peroxide, thiocyanate antimicrobial system: correlation of sulfhydryl oxidation with antimicrobial action." Infect Immun **20**(2): 456-463.
- Thomas, E. L., K. P. Bates and M. M. Jefferson (1980). "Hypothiocyanate ion: detection of the antimicrobial agent in human saliva." J Dent Res **59**: 1466-1472.
- Thomas, E. L., K. P. Bates and M. M. Jefferson (1981). "Peroxidase anti-microbial system of human-saliva - requirements for accumulation of hypothiocyanite." J Dent Res **60**(4): 785-796.

- Thomas, E. L., P. M. Bozeman, M. M. Jefferson and C. C. King (1995). "Oxidation of bromide by the human-leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase - formation of bromamines." J Biol Chem **270**(7): 2906-2913.
- Thomas, E. L., M. M. Jefferson, R. E. Joyner, G. S. Cook and C. C. King (1994). "Leukocyte myeloperoxidase and salivary lactoperoxidase - identification and quantitation in human mixed saliva." J Dent Res **73**(2): 544-555.
- Thomas, E. L., T. W. Milligan, R. E. Joyner and M. M. Jefferson (1994). "Antibacterial activity of hydrogen-peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci." Infect Immun **62**(2): 529-535.
- Thomas, E. L. and K. A. Pera (1983). "Oxygen-metabolism of *Streptococcus mutans*: uptake of oxygen and release of superoxide and hydrogen peroxide." J Bacteriol **154**(3): 1236-1244.
- Thomas, E. L., K. A. Pera, K. W. Smith and A. K. Chwang (1983). "Inhibition of *Streptococcus mutans* by the lactoperoxidase antimicrobial system." Infect Immun **39**(2): 767-778.
- Thomson, E., S. Brennan, R. Senthilmohan, C. L. Gangell, A. L. Chapman, P. D. Sly, A. J. Kettle, F. Australian Respiratory Early Surveillance Team for Cystic, E. Balding, L. J. Berry, J. B. Carlin, R. Carzino, N. de Klerk, T. Douglas, C. Foo, L. W. Garratt, G. L. Hall, J. Harrison, A. Kicic, I. A. Laing, K. M. Logie, J. Massie, L. S. Mott, C. Murray, F. Parsons, N. Pillarisetti, S. R. Poreddy, S. C. Ranganathan, C. F. Robertson, R. Robins-Browne, P. J. Robinson, B. Skoric, S. M. Stick, E. N. Sutanto and E. Williamson (2010). "Identifying peroxidases and their oxidants in the early pathology of cystic fibrosis." Free Radic Biol Med **49**(9): 1354-1360.
- Toljanic, J. A., A. A. Siddiqui, G. L. Patterson and M. E. Irwin (1996). "An evaluation of a dentifrice containing salivary peroxidase elements for the control of gingival disease in patients with irradiated head and neck cancer." J Prosthet Dent **76**(3): 292-296.
- Tong, H., W. Chen, J. Merritt, F. Qi, W. Shi and X. Dong (2007). "Streptococcus oligofermentans inhibits *Streptococcus mutans* through conversion of lactic acid into inhibitory H₂O₂: a possible counteroffensive strategy for interspecies competition." Mol Microbiol **63**(3): 872-880.
- Tsumori, H. and H. Kuramitsu (1997). "The role of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases in the sucrose-dependent attachment to smooth surfaces: essential role of the GtfC enzyme." Oral Microbiol Immunol **12**(5): 274-280.
- Turesky, S., N. D. Gilmore and I. Glickman (1970). "Reduced plaque formation by the chloromethyl analogue of vitamin C." J Periodontol **41**(1): 41-43.
- van 't Hof, W., E. C. Veerman, A. V. Nieuw Amerongen and A. J. Ligtenberg (2014). "Antimicrobial defense systems in saliva." Monogr Oral Sci **24**: 40-51.
- van Dalen, C. J. and A. J. Kettle (2001). "Substrates and products of eosinophil peroxidase." Biochem J **358**: 233-239.
- van Haeringen, N. J., F. T. E. Ensink and E. Glasius (1979). "Peroxidase-thiocyanate-hydrogenperoxide system in tear fluid and saliva of different species." Exp Eye Res **28**(3): 343-347.

- van Steenberghe, D., E. van den Eynde, R. Jacobs and M. Quirynen (1994). "Effect of a lactoperoxidase containing toothpaste in radiation-induced xerostomia." Int Dent J **44**(2): 133-138.
- Vesey, C. J. and P. V. Cole (1985). "Blood cyanide and thiocyanate concentrations produced by long-term therapy with sodium nitroprusside." Br J Anaesth **57**(2): 148-155.
- Vidovic, A., D. Vidovic Juras, V. Vucicevic Boras, J. Lukac, M. Grubisic-Ilic, D. Rak and A. Sabioncello (2012). "Determination of leucocyte subsets in human saliva by flow cytometry." Arch Oral Biol **57**(5): 577-583.
- Vilja, P., M. Lumikari, J. Tenovuo, G. Sievers and P. Tuohimaa (1991). "Sensitive immunometric assays for secretory peroxidase and myeloperoxidase in human saliva." J Immunol Methods **141**(2): 277-284.
- Voet, D. J., J. G. Voet and C. W. Pratt (2010). Lysozym. In: Lehrbuch der Biochemie. Weinheim, Wiley-VCH: 370.
- Vujicic-Zagar, A., T. Pijning, S. Kralj, C. A. Lopez, W. Eeuwema, L. Dijkhuizen and B. W. Dijkstra (2010). "Crystal structure of a 117 kDa glucansucrase fragment provides insight into evolution and product specificity of GH70 enzymes." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(50): 21406-21411.
- Webb, A. J., N. Patel, S. Loukogeorgakis, M. Okorie, Z. Aboud, S. Misra, R. Rashid, P. Miall, J. Deanfield, N. Benjamin, R. MacAllister, A. J. Hobbs and A. Ahluwalia (2008). "Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite." Hypertension **51**(3): 784-790.
- Weitzberg, E. and J. O. Lundberg (1998). "Nonenzymatic nitric oxide production in humans." Nitric Oxide **2**(1): 1-7.
- Welk, A., C. Meller, R. Schubert, C. Schwahn, A. Kramer and H. Below (2009). "Effect of lactoperoxidase on the antimicrobial effectiveness of the thiocyanate hydrogen peroxide combination in a quantitative suspension test." BMC Microbiol **9**: 134.
- Welk, A., P. Rudolph, J. Kreth, C. Schwahn, A. Kramer and H. Below (2011). "Microbicidal efficacy of thiocyanate hydrogen peroxide after adding lactoperoxidase under saliva loading in the quantitative suspension test." Arch Oral Biol **56**(12): 1576-1582.
- Weller, R., R. J. Price, A. D. Ormerod, N. Benjamin and C. Leifert (2001). "Antimicrobial effect of acidified nitrite on dermatophyte fungi, candida and bacterial skin pathogens." J Appl Microbiol **90**(4): 648-652.
- Weuffen, W., A. Kramer, H. Below, H. Bohland, W. D. Julich, B. Thurkow and U. Burth (1990). "The thiocyanate ion as a physiologically significant active substance in living nature." Pharmazie **45**(1): 16-29.
- Wijkstrom-Frei, C., S. El-Chemaly, R. Ali-Rachedi, C. Gerson, M. A. Cobas, R. Forteza, M. Salathe and G. E. Conner (2003). "Lactoperoxidase and human airway host defense." Am J Respir Cell Mol Biol **29**(2): 206-212.
- Wilkens, T. J., H. Goodman, B. J. MacKay, V. J. Iacono and J. J. Pollock (1982). "Bacteriolysis of *Streptococcus mutans* GS5 by lysozyme, proteases, and sodium thiocyanate." Infect Immun **38**(3): 1172-1180.

- Wilson, M. (1996). "Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents." J Med Microbiol **44**(2): 79-87.
- Wissing, F. (1974). "Cyanide formation from oxidation of glycine of pseudomonas species." J Bacteriol **117**(3): 1289-1294.
- Wohlrab, W. (1989). "Significance of urea in external therapy." Hautarzt **40 Suppl 9**: 35-41.
- Wokes, F., P. Wedgwood and J. Wyatt (1952). "Thiocyanates in milk and other biological fluids." Biochem J **50**(3): 19-20.
- Wright, W. G., C. Thelwell, B. Svensson and R. R. Russell (2002). "Inhibition of catalytic and glucan-binding activities of a streptococcal GTF forming insoluble glucans." Caries Res **36**(5): 353-359.
- Xu, Y., S. Szep and Z. Lu (2009). "The antioxidant role of thiocyanate in the pathogenesis of cystic fibrosis and other inflammation-related diseases." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(48): 20515-20519.
- Yamanaka, S., S. Takaku, Y. Takaesu and M. Nishimura (1991). "Validity of salivary thiocyanate as an indicator of cyanide exposure from smoking." Bull Tokyo Dent Coll **32**(4): 157-163.
- Zaura-Arite, E., J. van Marle and J. M. ten Cate (2001). "Conofocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm." J Dent Res **80**(5): 1436-1440.
- Zheng, L., A. Itzek, Z. Chen and J. Kreth (2011). "Environmental influences on competitive hydrogen peroxide production in Streptococcus gordonii." Appl Environ Microbiol **77**(13): 4318-4328.
- Zhu, L. and J. Kreth (2012). "The role of hydrogen peroxide in environmental adaptation of oral microbial communities." Oxid Med Cell Longev **2012**: 1-10.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1, Bestandteile des Speichelperoxidase-Systems	18
Abbildung 2, Enzymatische Aktivität der Lactoperoxidase	19
Abbildung 3, Beeinflussung des Bakterienstoffwechsels durch das Peroxidase-System	23
Abbildung 4, Plaqueaufwuchs am 5. Tag	37
Abbildung 5, Logarithmierte Anzahl koloniebildender Einheiten <i>S. mutans</i> am 5. Tag	38
Abbildung 6, Logarithmierte Anzahl koloniebildender Einheiten Lactobacillen am 5. Tag	39
Abbildung 7, Logarithmierte Anzahl koloniebildender Einheiten Gesamtkeimzahl am 5. Tag.....	40
Abbildung 8, OSCN^- (mg/l) am 5. Tag.....	41
Abbildung 9, SCN^- (mg/l) am 5. Tag.....	42
Abbildung 10, NO_3^- (mg/l) am 5. Tag.....	44
Abbildung 11, NO_3^- ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag.....	45
Abbildung 12, $\ln(\text{NO}_3^-)$ ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag.....	46
Abbildung 13, NO_2^- (mg/l) am 5. Tag.....	47
Abbildung 14, NO_2^- ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag.....	48
Abbildung 15, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ (mg/l) am 5. Tag.....	49
Abbildung 16, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag.....	50
Abbildung 17, $\ln(\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-)$ ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag.....	51

9 Formelverzeichnis

Formel 1, Peroxidase katalysierte Bildung von Hypothiocyanit.	18
Formel 2, Oxidation essentieller Sulfhydrylgruppen durch Hypothiocyanit.	20
Formel 3, Säure-Base-Gleichgewicht zwischen Hypothiocyanit und Hypothiocyansäure.	21

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1, Konzentrationsangaben von hMPO und hSPO im Speichel	12
Tabelle 2, Zusammenstellung der ermittelten SCN^- Werte.....	14
Tabelle 3, Alter und Anzahl der Zähne der Probanden.....	29
Tabelle 4, Zusammensetzung der Dragees in mg	33
Tabelle 5, p-Werte zu Abbildung 5	38
Tabelle 6, p-Werte zu Abbildung 6	39
Tabelle 7, p-Werte zu Abbildung 7	40
Tabelle 8, Beschreibende Statistik OSCN^- (mg/l) am 5. Tag.....	41
Tabelle 9, p-Werte zu Abbildung 8	42
Tabelle 10, Beschreibenden Statistik SCN^- (mg/l) am 5. Tag.....	43
Tabelle 11, p-Werte zu Abbildung 9	43
Tabelle 12, Beschreibende Statistik NO_3^- (mg/l) am 5. Tag	44
Tabelle 13, p-Werte zu Abbildung 10	45
Tabelle 14, Beschreibende Statistik NO_3^- ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag.....	45
Tabelle 15, Beschreibende Statistik $\ln(\text{NO}_3^-)$ ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag	46
Tabelle 16, p-Werte zu Abbildung 12	46
Tabelle 17, Beschreibende Statistik NO_2^- (mg/l) am 5. Tag	47
Tabelle 18, p-Werte zu Abbildung 13	48
Tabelle 19, Beschreibende Statistik NO_2^- ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag.....	48
Tabelle 20, Beschreibende Statistik $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ (mg/l) am 5. Tag	49
Tabelle 21, p-Werte zu Abbildung 15	50
Tabelle 22, Beschreibende Statistik $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag	50
Tabelle 23, Beschreibende Statistik $\ln(\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-)$ ($\mu\text{mol/l}$) am 5. Tag	51
Tabelle 24, p-Werte zu Abbildung 17	51

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt vor allem Herrn OA PD Dr. Welk, der mir dieses interessante Promotionsthema überlassen hat. Seine kreative Art Diskussionspunkte anzugehen und seine sehr wertvollen fachlichen Hinweise, waren stets eine große und weiterführende Bereicherung.

Herrn PD Dr. Below danke ich besonders für seine fachlich sehr kompetente Betreuung während meiner Dissertation.

Seinem Team, Frau Dr. Baguhl, Frau Zellmer und Frau Geßner, welches die chemische Analyse durchgeführt hat, bin ich ebenso zu tiefstem Dank verpflichtet.

Ohne die enge Zusammenarbeit mit der bmp Parchim GmbH wäre diese Studie nicht möglich gewesen, daher gilt mein besonderer Dank Frau Jäschke und Herrn Neubauer sowie Herrn Dr. Heiden von der Forschungsförderung der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.

Frau Dr. Gärtner möchte ich für die praktische Unterstützung bei der Durchführung der Studie danken. Ebenso gilt mein großer Dank Herrn Dr. Schwahn für die fachliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Danken möchte ebenfalls den Mitarbeiterinnen der Hygiene Nord GmbH für die Durchführung der bakteriellen Analyse.

Die vorliegende Studie ist Teil des Projekts „**L**arge **P**rotection of **O**ral Health“. Dieses Projekt wurde gefördert vom Ministerium für Wirtschaft, Bau und Tourismus des Bundeslandes Mecklenburg-Vorpommern, daher gilt an dieser Stelle auch dem Land mein großer Dank.

Abschließend ein großes Dankeschön an meine Eltern und Großeltern, die mir jederzeit Unterstützung, Kraft und Liebe während des Studiums und der Promotion gegeben haben. Niemals werde ich vergessen, was Ihr mir ermöglicht habt.