

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchung zur Wirksamkeit von Mundspüllösungen und Tee auf gingivitis-assoziierten  
Bakterien, die während der festsitzenden kieferorthopädischen Therapie auftreten: eine *in  
vitro*-Studie.

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Zahnmedizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Elaine Klippel  
aus Wiesbaden

Mainz, 2020

Tag der Promotion:

30. Juni 2020

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	2
Abbildungsverzeichnis.....	3
Tabellenverzeichnis.....	4
1. Einleitung .....	5
2. Literaturdiskussion .....	7
2.1. Ätiologie und Pathogenese der Gingivitis .....	7
2.2. Mikrobiologie der Gingivitis bei KFO-Patienten.....	8
2.3. Prävention und Therapie der Gingivitis .....	12
2.3.1. Chlorhexidin .....	12
2.3.2. Fluoride .....	13
2.3.3. Ätherische Öle .....	14
2.3.4. Grüner Tee .....	15
2.3.5. <i>Lonicera japonica</i> .....	16
2.4. Zielsetzung .....	17
3. Material und Methoden .....	18
3.1. Arzneimittelpflanzen und Teezubereitung.....	18
3.2. Mundspüllösungen .....	19
3.3. Mikroorganismen.....	21
3.4. Nährmedien.....	22
3.5. Versuchsprinzip.....	23
3.6. Vorversuche .....	23
3.7. Kultivierung der Mikroorganismen .....	27
3.8. Durchführung des Agardiffusionstests .....	28
3.9. Statistische Auswertung .....	30
4. Ergebnisse .....	31
4.1. Vergleich der Hemmhofdurchmesser aller Mundspüllösungen .....	31
4.2. Vergleich der Hemmhofdurchmesser der getesteten Bakterien .....	36
4.3. Vergleich der NaF-Lösungen.....	38
4.4. Vergleich des gram-Färbeverhalten und Stoffwechselerhaltens.....	39
5. Diskussion der Ergebnisse.....	40
5.1. Methodendiskussion.....	40
5.2. Ergebnisdiskussion.....	42
6. Zusammenfassung .....	51
7. Literaturverzeichnis.....	52
Danksagung .....	61

## Abkürzungsverzeichnis

*A. actinomycetemcomitans* = *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

AmF = Aminfluorid

BOP = Bleeding on Probing

CHX = Chlorhexidin

CPC = Cetylpyridinium-Chlorid

DGZMK = Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

DSMZ = Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

*F. nucleatum* = *Fusobacterium nucleatum*

KFO = Kieferorthopädie

*L. japonica* = *Lonicera japonica*

MBA = Multibracket-Apparatur

MHK = minimale Hemmkonzentration

NaF = Natriumfluorid

*P. gingivalis* = *Porphyromonas gingivalis*

*P. intermedia* = *Prevotella intermedia*

*S. mutans* = *Streptokokkus mutans*

SnF = Zinnfluorid

TCM = Traditionelle Chinesische Medizin

## Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Ätiologie von Gingivitis mod. nach Marsh [26] . 7

**Abbildung 2:** Grüner Tee „Sencha“ von Weltecke und japanische Geißblattblüten von HerbaSinica ..... 18

**Abbildung 3:** verwendete Mundspüllösungen (von links: Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei, Sensodyne® ProSchmelz®, ACT® Anticavity Kids Ocean Berry®, Listerine® Zero™) ..... 19

**Abbildung 4:** Beimpfte Agarplatten mit grüner Tee „Sencha“ (oben rechts) mit dest. Wasser (oben links) und Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei (unten links) auf *S. mutans*..... 25

**Abbildung 5:** Beimpfte Agarplatten mit *L. japonica* (oben rechts) und Grüner Tee Meißner (unten rechts) mit sterilem dest. Wasser (oben links) und Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei (unten links) auf *S. mutans* ..... 26

**Abbildung 6:** Columbia Agarplatte mit *S. mutans* und vier Celluloseblättchen nach 48 h Bebrütung im Kerzentopf (links: oben steriles destilliertes Wasser, unten Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei; rechts: oben Sensodyne® ProSchmelz®, unten Listerine® Zero™) ..... 29

**Abbildung 7:** Hemmhofdurchmesser für die untersuchten Bakterien (*A. actinomycetemcomitans*, *A. israelii*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *S. mutans*) mit Mittelwerten, sortiert nach den Testlösungen: ACT® Anticavity Kids OceanBerry®, Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei, Grüner Tee, *L. japonica*, Listerine® Zero™ und Sensodyne® ProSchmelz®. Die gemessenen Hemmhofdurchmesser sind als farbige Punkte dargestellt, deren Mittelwerte aus den drei Versuchsansätzen als „x“ ..... 33

**Abbildung 8:** Darstellung der Ergebnisse des Tukey Post-Hoc-Tests ( $\alpha = 0,05$ ) für den Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Substanzen: ACT® Anticavity Kids OceanBerry® (ACT), Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei (CHX), Grüner Tee (GrT), *L. japonica* (LJ), Listerine® Zero™ (LZ) und Sensodyne® ProSchmelz® (SP). Die signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzen sind als blaue Linien dargestellt. .... 35

**Abbildung 9:** Darstellung der Ergebnisse des Tukey Post-Hoc-Tests ( $\alpha = 0,05$ ) für den Vergleich der Mittelwerte der getesteten Bakterien: *A. actinomycetemcomitans*, *A. israelii*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *S. mutans*. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Testkeimen sind als blaue Linien dargestellt..... 37

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Literaturübersicht zur Mikrobiologie bei KFO-Patienten mit Gingivitis .....	9
<b>Tabelle 2:</b> Inhaltsstoffe der verwendeten Mundspüllösungen .....	20
<b>Tabelle 3:</b> verwendete Bakterienstämme mit Eigenschaften .....	21
<b>Tabelle 4:</b> Kulturmedien der Keime gemäß den Richtlinien und Anleitungen der DSMZ.....	22
<b>Tabelle 5:</b> Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser aller getesteten Bakterien aufgeteilt nach den einzelnen Substanzen: ACT® Anticavity Kids OceanBerry® (ACT), Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei (CHX), Grüner Tee (GrT), L. japonica (LJ), Listerine® Zero™ (LZ) und Sensodyne® ProSchmelz® (SP) .....	34
<b>Tabelle 6:</b> Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser aller Substanzen aufgeteilt nach den einzelnen Bakterien: A.actinomycetemcomitans, A. israelii, F. nucleatum, P. gingivalis, P intermedia und S. mutans .....	36
<b>Tabelle 7:</b> Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser, Konfidenzintervalle und p-Werte des Vergleichs der Wirkung von ACT® Anticavity Kids OceanBerry® (ACT) und Sensodyne® ProSchmelz® (SP) auf die einzelnen Mikroorganismen.....	38
<b>Tabelle 8:</b> Mittelwerte aller Hemmhofdurchmesser sortiert nach gram-Färbeverhalten der Mikroorganismen .....	39
<b>Tabelle 9:</b> Mittelwerte aller Hemmhofdurchmesser sortiert nach Stoffwechselerhalten der Mikroorganismen .....	39

## 1. Einleitung

Ziel einer kieferorthopädischen Therapie ist die Korrektur von Zahn- und Kieferfehlstellungen. In der Regel beginnt die Therapie mit herausnehmbaren Apparaturen und wird mit festsitzenden, sogenannten Multibracket-Apparaturen (MBA), fortgesetzt. Nachteile der Behandlung mit MBA sind die vorübergehend erschwerte Mundhygiene und eine damit einhergehende erhöhte Plaqueakkumulation [1-3]. Auch bei guter Mundhygiene ist die vermehrte Ansammlung von Plaque auf Brackets und Befestigungskompositen festzustellen [1, 4, 5]. Zudem ist die physiologische Selbstreinigung durch die orofaziale Muskulatur gestört [3, 6, 7].

Ein Großteil des Patientenkollektivs besteht aus Kindern und Jugendlichen. Nahezu alle Minderjährigen weisen an mindestens einer Zahnfläche eine gingivale Inflammation auf [8-10]. Laut der Fünften Deutschen Mundgesundheitsstudie 2016 (DMS V) lag die Prävalenz für Gebisse mit geringen Entzündungszeichen bei Kindern im Alter von 12 Jahren bei 68,5%. Eine ausgeprägte Entzündung konnte bei weiteren 10% beobachtet werden [10]. Massler et al. [11] stellten bereits 1950 die Zunahme des Schweregrades von Gingivitis während der Pubertät fest. Ursächlich scheinen die während der Kindheit und Pubertät vermehrt vernachlässigte Mundhygiene und die Hormonumstellung zu sein [8]. Laut der Vierten Deutschen Mundgesundheitsstudie 2006 (DMS IV) wird bei der Hälfte der Heranwachsenden eine kieferorthopädische Behandlung geplant oder bereits durchgeführt [12]. In der DMS V fand die kieferorthopädische Behandlung keine Berücksichtigung [10]. Laut der kassenzahnärztlichen Bundesvereinigung wurden im Jahr 2016 bei mehr als 7900 Patienten kieferorthopädische Behandlungen abgerechnet [13].

Ein Behandlungsziel ist die Erleichterung der Mundhygiene und damit die Prävention von Karies und Parodontitis durch die Korrektur von Zahnfehlstellungen [14]. Während der Therapie führt die erhöhte Plaqueakkumulation an kieferorthopädischen Geräten, auch entlang des Gingivasaumes, häufig zu Gingivitis. Vor allem während der Therapie mit MBA zeigen sich bei nahezu 100% der Patienten zeitweise die klinischen Zeichen einer Gingivitis (Rötung, Schwellung, Blutung auf Sondieren und Pseudotaschen) [2, 15, 16]. Die Lebensqualität der Patienten kann durch Gingivahyperplasien der Incisivi eingeschränkt sein [17]. Wird die inflammatorische Reaktion des Gewebes nicht eingedämmt, kann eine Parodontitis resultieren, welche Zahnwanderungen und Zahnverluste zur Folge hat [2].

Neben dem klinischen Erscheinungsbild der Gingiva ändert sich auch die Mikroflora von grampositiven aeroben zu gramnegativen anaeroben Mikroorganismen mit pathogenem Potential. Die Anzahl der parodontalpathogenen Keime im Sulcus gingivae steigt deutlich an [5, 15, 16].

Zur Prävention und Therapie von Gingivitis ist neben der mechanischen Reinigung auch eine chemische Plaquerreduktion mit Mundspüllösungen sinnvoll [18-20]. Therapeutisch wird vor allem Chlorhexidin (CHX) empfohlen. Zur Prävention werden häufig Fluoridlösungen, auch in Kombination mit ätherischen Ölen, eingesetzt [7, 21]. Auch Pflanzen und deren Inhaltsstoffe wurden bereits als Alternativen zu herkömmlichen Mundspülungen untersucht [22, 23].

Ziel der Studie war die Überprüfung der gezielten antibakteriellen Wirkung von geeigneten Mundspüllösungen im Vergleich zu pflanzlichen Tees auf Bakterien, die häufig bei Patienten mit Gingivitis während der Therapie mit MBA auftreten.

## 2. Literaturdiskussion

### 2.1. Ätiologie und Pathogenese der Gingivitis

Die häufigste bei Kindern und Jugendlichen anzutreffende Form der Gingivitis ist die plaqueinduzierte Gingivitis [24]. Die Ursache für die inflammatorische Reaktion der Gingiva ist der dentale Biofilm, auch Zahnplaque genannt [24, 25]. Dieser Biofilm besteht aus Mikroorganismen, eingeschlossen in einer komplexen Matrix aus Substraten und Produkten ihres Stoffwechsels [25, 26]. Zahnplaque stellt sich klinisch als weicher, strukturierter, an der Zahnhartsubstanz adhärenter Belag dar. Es wird zwischen supragingivaler, koronal des Gingivasaumes, und subgingivaler, im Sulcus gingivae befindlicher Plaque unterschieden. Der Unterschied der beiden Formen liegt nicht nur in ihrer Position, sondern auch in der Zusammensetzung der in der Plaque vorkommenden Mikroorganismen [25]. Die Plaqueretention kann durch viele lokale Faktoren, wie die Zahnanatomie, Zahnfehlstellungen, Mundatmung, okklusale Kräfte, Ernährung und Speichel begünstigt werden [5, 25]. Auch der Zungenrücken stellt ein Reservoir für Mikroorganismen dar [27].

Klinisch lassen sich an der Gingiva fünf bis sieben Tage nach Plaqueneubildung typische Entzündungszeichen wie Rötung, Schwellung und Blutung auf Sondieren feststellen [8, 25]. Durch die ödematöse Schwellung bilden sich Pseudotaschen, die keinen Attachmentverlust des Alveolarfortsatzes aufweisen [8, 9, 15, 25].

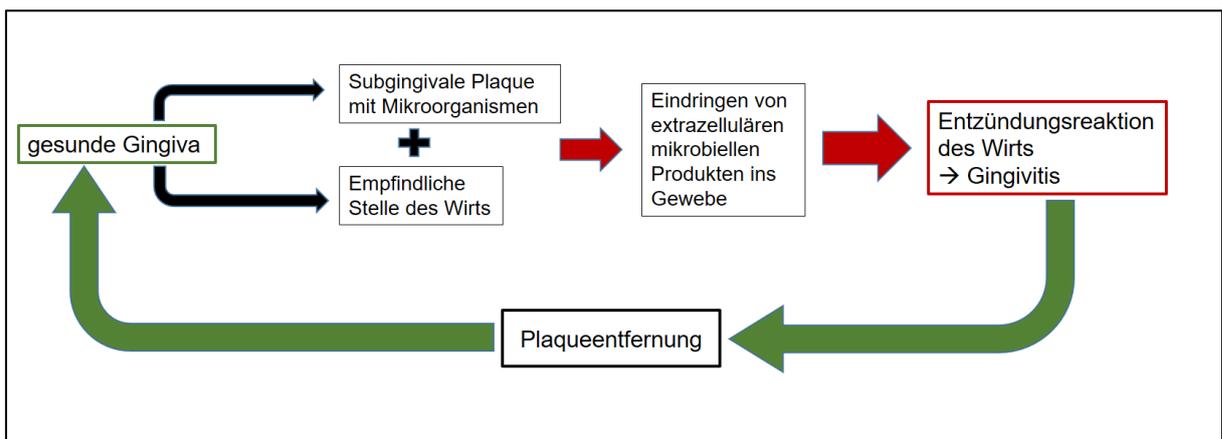


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ätiologie von Gingivitis mod. nach Marsh [26]

Histologisch lassen sich drei verschiedene Stadien der Gingivitis unterscheiden: initiale und frühe Läsion imponieren klinisch als akute Entzündung, die etablierte Läsion entspricht einer chronischen Gingivitis [24, 25]. Zwei bis vier Tage nach Plaqueneubildung erhöht sich die Gefäßpermeabilität, neutrophile Granulozyten wandern aus den Gefäßen in umliegendes Gewebe und das Saumepithel wird durch Kollagenabbau aufgelockert [26]. Anschließend verstärkt sich im Rahmen der frühen Läsion die Reaktion des Gewebes mit Beteiligung von T-Lymphozyten und das Saumepithel beginnt zu proliferieren. Bei einer chronischen Entzündung, einer etablierten Läsion, dominieren B-Lymphozyten und Immunglobuline die Immunreaktion. Das Stützgewebe ist fast vollständig aufgelöst, während das Saumepithel nach apikal und lateral proliferiert [25]. Gemeinsam ist diesen drei Phasen im Gegensatz zur fortgeschrittenen Läsion bei einer manifesten Parodontitis, die Reversibilität [9, 25]. Nach Entfernung der Plaque ist bei Gingivitis mit einer Restitutio ad integrum zu rechnen [26].

## 2.2. Mikrobiologie der Gingivitis bei KFO-Patienten

Neben dem typischen klinischen Bild der Gingivitis zeigt sich bei Patienten der Kieferorthopädie (KFO) häufig die mikrobiologische Flora ähnlich einer Parodontitis [28]. Diese ist maßgeblich für die Entzündungsreaktion des Gingivaepithels [8, 25, 26]. Durch das sauerstoffarme Milieu im Sulcus erhöht sich die Anzahl von anaeroben gramnegativen Keimen, welche die Immunreaktion des Wirtes auslösen [26]. Diese Änderung in der Zusammensetzung der subgingivalen Plaque wird als „Bacteria Shift“ bezeichnet [5, 15, 29]. Die klinische Ausprägung der Entzündung scheint an Zähnen mit kieferorthopädischen Bändern stärker zu sein als an Zähnen mit Brackets [30]. Nach Entfernung der MBA ist in der Regel ein Rückgang der Inflammation zu erkennen [2, 31, 32]. In einigen Studien wurde die Mikroflora in Zusammenhang mit Gingivitis bei der Therapie mit festsitzenden Apparaturen untersucht. Dabei entwickelten die Patienten in allen Untersuchungen zumindest leichte Gingivitiden [15, 16, 31-37] (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Literaturübersicht zur Mikrobiologie bei KFO-Patienten mit Gingivitis

Autor (Jahr)	Anzahl der Patienten	Alter	Klinische Parameter	Zähne für Probenentnahme	mikrobiologische Methoden	Ergebnis
Liu et al. (2014)	55	ø16,3 Jahre	Gingiva-Index → Anstieg, Gingivitis	16, 12, 24, 36, 32, 44	Polymerase chain reaction (PCR)	Anstieg der Prävalenz für <i>Fusobacterium nucleatum</i>
Torlakovic et al. (2013)	20	10-16 Jahre	Fotos, Plaque-Index → Gingivitis bei 75%	11, 21	Polymerase chain reaction (PCR)	Anstieg der pathogenen Bakterienzahl nicht signifikant Abnahme von Spezies, die mit gesunder Flora assoziiert werden
Liu et al. (2011)	48	ø 17,7 Jahre	Plaque-Index, Gingiva-Index, Sondierungstiefe → Gingivitis	31, 32, 41, 42	Polymerase chain reaction (PCR)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (Reduktion nach MBA-Entfernung)
Cardoso-Silva et al. (2011)	60	nicht angegeben	Gingiva-Index, Plaque-Index → Plaque-Index bei Gruppe mit MBA höher	21, 22, 41, 42	Kultur	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Eikenella corrodens</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> vorherrschend
Ristic et al. (2007)	32	12-18 Jahre	Sondierungstiefe → Anstieg, Pseudotaschen	16, 21, 24	Kultur (verschiedene Medien), Kolonienzählung	Anstieg von <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i>
Naranjo et al. (2006)	30	ø18,7Jahre	Plaque-Index, Gingiva-Index, BOP, Sondierungstiefe → Gingivitis nach drei Monaten MBA	15, 12, 22, 25, 35, 45	Kultur (verschiedene Medien), Kolonienzählung	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Prevotella intermedia</i> erhöht; generell höhere Keimzahlen nach drei Monaten MBA
Sallum et al. (2004)	10	12-20 Jahre	Plaque-Index, BOP, Sondierungstiefe → Rückgang aller Indizes nach MBA-Entfernung	16, 11, 26	Polymerase chain reaction (PCR)	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Tannerella forsythia</i> - Reduktion 30 Tage nach MBA-Entfernung
Paolantonio et al. (1999)	24	18-22 Jahre	Plaque-Index, Bleeding on Probing (BOP), Sondierungstiefe → Gingivitis, Pseudotaschen nur an Zähnen mit MBA	16, 26, 36, 46, 12, 22, 32, 42	Kultur (verschiedene Medien), Kolonienzählung	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> bei 20 Patienten an Zähnen mit MBA, nur bei einem Pat. auch an Zähnen ohne MBA
Diamanti-Kipoti et al. (1987)	12	10-15 Jahre	Gingiva-Index Sondierungstiefe → Gingivitis + Pseudotaschen	16	Kultur (verschiedene Medien), Kolonienzählung	<i>Prevotella intermedia</i> , Actinomyzeten und Keimzahl insgesamt erhöht
Purucker et al. (1987)	12	11-23 Jahre	keine	willkürlich ausgewählt	Dunkelfeldmikroskop, Kolonienzählung	Anstieg der Stäbchen, Fusobakterien und Spirochäten bei Band- und Bracket-Therapie
Müller, H.-P. et al. (1982)	22	12-14 Jahre	keine	24, 44, 25, 45	Dunkelfeldmikroskop, Kolonienzählung	Abfall der mit gesunder Flora assoziierten Kokken und signifikanter Anstieg von Fusobakterien

Die detektierten Keimspektren dieser Studien sind nicht identisch, was vermutlich an den angewandten Labormethoden (PCR oder Kultivierung) und der Probenentnahme an unterschiedlichen Zähnen mit und ohne klinisch sichtbare Gingivitis liegt. Allerdings lässt sich ein Trend erkennen: Während der Behandlung mit MBA steigt die Anzahl an parodontalpathogenen Keimen parallel zum Plaque-Index und Gingiva-Index an. Dagegen ist ein Rückgang der Mikroorganismen zu verzeichnen, die mit einer gesunden Flora assoziiert sind [4, 16, 38]. Nach der Entfernung von festsitzenden Apparaturen konnte eine Reduktion von parodontalpathogenen Keimen festgestellt werden [31, 32, 37]. Außerdem wird vermutet, dass Mikroorganismen, die mit Gingivitis assoziiert werden, auch an der Entstehung von White-Spot-Läsionen (WSL) beteiligt sind [39]. Es ist also essenziell das Wachstum dieser potenziell pathogenen Keime, während der Therapie mit MBA, durch Mundhygienemaßnahmen einzudämmen, um eine plaqueinduzierte Gingivitis zu vermeiden. Am häufigsten wurde ein Anstieg von *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) und *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) festgestellt [15, 31, 33-36]. Bei diesen Keimen handelt es sich um obligat anaerobe gramnegative Stäbchen [26].

*F. nucleatum* baut Aminosäuren zu Buttersäure, Schwefelwasserstoff, Mercaptanen und anderen organischen Verbindungen ab, die für den typischen Geruch bei Halitosis verantwortlich gemacht werden. Außerdem koaggregiert *F. nucleatum* mit vielen anderen oralen Mikroorganismen und wird daher als brückenbildender Organismus zwischen Früh- und Spätbesiedlern der Plaque angesehen [26, 40, 41].

*P. intermedia* hat einen saccharolytischen Stoffwechsel und setzt Glucose zu Essigsäure und Bernsteinsäure um. Verschiedene Peptidasen, die das Wirtsgewebe schädigen können, gehören ebenfalls zu den Stoffwechselprodukten. *P. intermedia* gehört zu den Frühbesiedlern und koaggregiert mit anderen Spezies, wie *P. gingivalis* [26, 41, 42].

*P. gingivalis* befindet sich fast ausschließlich subgingival und besitzt eine Kapsel, welche zur Anheftung an Zahnoberflächen und orale Epithelzellen dient [41, 43]. Hämin zählt zu seinen essenziellen Wachstumsfaktoren. Virulenzfaktoren, wie Hämolyse und Kollagenasen, zerstören Gewebe und dienen zur Umgehung der Wirtsabwehr [26, 44, 45]. Durch seine Fähigkeit die Wirtsabwehr zu manipulieren und mit anderen Spezies zu koaggregieren, wird *P. gingivalis* auch als Schlüsselart in der Steigerung der Plaquepathogenität bezeichnet [45].

Auch der invasive Keim *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), der Haupterreger der aggressiven lokalisierten Parodontitis bei Jugendlichen, konnte teilweise bei Patienten mit MBA nachgewiesen werden [26, 32, 37]. Seine Zelloberfläche weist Moleküle auf, die das Immunsystem zur Knochenresorption anregen. Zu den Virulenzfaktoren gehören Leukotoxin, Kollagenase und Proteasen. Es kommen invasive und nicht-invasive Stämme vor [26, 41].

Ein großer Anteil der Plaque, besonders im Sulcus, wird von Actinomyces-Arten gebildet. Die Anzahl der Actinomyzeten, unter anderem von *Actinomyces israelii* (*A. israelii*), steigt bei Gingivitis von Kindern und Jugendlichen, sowie KFO-Patienten an [15, 26, 39]. *A. israelii* ist ein grampositives Stäbchenbakterium, das ein filamentöses Wachstum zeigt. Actinomyzeten gehören zu den Frühbesiedlern, verstoffwechseln Glucose zu Bernstein-, Essig- und Milchsäure und sind an der Entstehung von Gingivitis und Wurzelkaries beteiligt [26].

*Streptokokkus mutans* (*S. mutans*) gilt als Haupterreger der Karies. Der grampositive, fakultativ anaerobe Erreger ist auch an der Entstehung von Glattflächenkaries und White-Spot-Läsionen beteiligt [25, 26, 39, 46, 47]. Allerdings wird die Pathogenität von anderen Mikroorganismen und Wirtsfaktoren stark beeinflusst, sodass eine erhöhte Anzahl von *S. mutans* auch bei kariesfreien Gebissen vorkommen kann. Seine Kariogenität besteht darin, aus Saccharose extrazelluläre Glukane zu synthetisieren, die eine starke Adhäsion an Zahnoberflächen ermöglichen. Außerdem produziert *S. mutans* organische Säuren, die zur Demineralisation von Zahnhartsubstanzen führen [25, 26, 41].

### 2.3. Prävention und Therapie der Gingivitis

Für eine suffiziente Mundhygiene zur Prävention von Karies und Gingivitis empfiehlt die Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) mindestens zweimal täglich eine mechanische Plaquerreduktion [18]. Dabei können elektrische Zahnbürsten durch ihre leichtere Handhabung bessere Ergebnisse erzielen als Handzahnbürsten [48, 49]. Zur Realisierung einer entzündungsfreien Gingiva ist die zusätzliche Verwendung von Zahnseide und/oder Interdentalraumbürsten einmal täglich notwendig [49]. Vor allem im posterioren Bereich verringern sich Plaque-Index und Gingivitisrisiko dadurch erheblich [50]. Mundhygieneinstruktionen und Remotivationen sind unerlässlich, um eine andauernde Entzündungsfreiheit während der Behandlung mit MBA zu erreichen [5, 19, 51]. Die visuelle Demonstration mit Plaquerelevatoren kann zu besseren Ergebnissen führen [51].

Eine Ergänzung zur mechanischen Reinigung stellt laut DGZMK die chemische Plaquerreduktion mit Zahnpasten, Spüllösungen, Gelen oder Lacken dar. Die verwendeten Mittel sollten eine gezielte Wirksamkeit gegen die mit Karies und Gingivitis assoziierten Keime besitzen [7, 18, 21, 23, 52]. Auch hier ist die Motivation der Patienten von entscheidender Bedeutung, um ihre Mitarbeit zu fördern [19, 53]. Mundspüllösungen ohne Alkohol mit Fluorid, ätherischen Ölen oder auch Chlorhexidin sind für Kinder und Jugendliche geeignet [20, 21].

#### 2.3.1. Chlorhexidin

Chlorhexidin gilt bis heute als wirkungsvollstes Agens der chemischen Plaquerreduktion und wird als Goldstandard bezeichnet [18, 21, 54]. Aufgrund seiner Wirksamkeit wird CHX als positive Kontrolle in Studien zu neuen Wirkstoffen verwendet [52, 54]. CHX besitzt ein breites Wirkspektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien, Pilze und lipophile Viren [54, 55]. Bei geringen Konzentrationen tritt eine reversible bakteriostatische Wirkung ein, bei höheren Konzentrationen ist die Wirkung bakterizid [54]. Eine Wirkstoffkonzentration von 0,2% inhibiert die Plaquebildung signifikant stärker als 0,12% CHX [56]. Durch die positive Ladung des Moleküls wird die negativ geladene Zellwand von Bakterien destabilisiert, indem CHX an die Phospholipidschicht der inneren Zellmembran bindet und zu Porenbildung führt. Bei höheren Wirkstoffkonzentrationen steigt der

Anteil an gebundenen Molekülen und damit die Durchlässigkeit der Zellmembran, was zum Zelltod der Bakterienzelle führt [53, 55]. Durch Bindung an alle anionischen Oberflächen der Mundhöhle, wie Zahnschmelz, Mukosa, Zunge und Speichelproteine, entsteht ein Reservoir und damit eine lange Wirkdauer von mehreren Stunden [54, 57-59].

Mehrere Studien mit Patienten, die MBA trugen, zeigten eine signifikante Plaquerreduktion mit einer Abnahme der gingivalen Entzündungszeichen durch regelmäßige Anwendung von CHX-Spüllösungen [7, 20, 60, 61]. Wegen unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie Zahnverfärbungen, Mundtrockenheit und Geschmacksirritationen wird von der präventiven, langfristigen Anwendung abgeraten [18, 56, 58, 60, 62].

Die Konzentration, ab der kein bakterielles Wachstum mehr feststellbar ist, die minimale Hemmkonzentration (MHK), lag in einer *in vitro* Studie von Stanley et al. [63] für 52 parodontalpathogene Keime im Mittel bei 62 µg/ml. Das bakterielle Wachstum in subgingival entnommenen Plaquestichproben wurde ab 250 µg/ml vollständig inhibiert. In einer Studie von Eick et al. [64] wurden gramnegative Anaerobier, wie *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis*, durch niedrigere Konzentrationen im Wachstum gehemmt, als grampositive Streptokokken. Die Entwicklung von Resistenzen gegenüber CHX, wie sie bei Antibiotika vorkommen können, konnte ausgeschlossen werden.

### 2.3.2. Fluoride

Fluorid wird zum Beispiel als Natriumfluorid (NaF), Aminfluorid (AmF) und Zinnfluorid (SnF) in Zahnpasten und Mundspüllösungen zur Kariesprävention eingesetzt und von der DGZMK empfohlen, um das Kariesrisiko im bleibenden Gebiss und im Milchgebiss zu senken [25, 65]. Die tägliche Anwendung von Mundspüllösungen mit 500 ppm Fluorid kann auch bei Jugendlichen, insbesondere während kieferorthopädischer Therapie mit festsitzenden Apparaturen, zur Kariesprävention beitragen und White-Spot-Läsionen vorbeugen [65, 66]. Bei Patienten mit Gingivitis konnte durch Spülung mit NaF oder einer Kombination aus AmF und SnF ein Rückgang von Plaque-Index, Gingiva-Index und Sulkusblutungsindex festgestellt werden. WSL traten bei Patienten mit MBA durch Spülung mit AmF und SnF weniger häufig auf, als nach Spülung mit NaF [67, 68]. Eine Studie zu Dentin-

Überempfindlichkeit zeigte neben der Verbesserung der Hypersensibilität auch einen Rückgang des Plaque-Index der Patienten durch Spülung mit einer NaF-Lösung [69]. Die bakterizide Wirkung auf parodontalpathogene Keime wurde von Qian et al. [70] untersucht, wobei *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* die höchste Sensitivität zeigten. Thomas et al. [21] konnten in einer *in vitro* Studie die Wirksamkeit einer NaF-Mundspülung auf *S. mutans*, *Candida albicans* und *Lactobacilli* nachweisen. Die Fluorid-Lösung zeigte eine höhere Wachstumshemmung als die Kombination von Fluorid mit ätherischen Ölen.

### 2.3.3. Ätherische Öle

Ätherische Öle inhibieren bakterielles Wachstum durch Hemmung der Enzymaktivität und Zerstörung der Zellwände. Sie sind daher als Therapeutikum bei bakteriellen Infektionen der Mundhöhle geeignet und kommen in vielen Pflanzen, wie zum Beispiel Eukalyptus, Lavendel, Minze, Thymian und Zitrone vor [59, 71-73].

Listerine® (Johnson & Johnson, Maidenhead, UK) wird häufig als Referenzprodukt für Mundspüllösungen mit ätherischen Ölen genannt. Die Lösung enthält Eucalyptol, Menthol, Methylsalicylat und Thymol. Das Produkt Listerine® Zero™ ist durch seine alkoholfreie Formulierung laut Hersteller auch für Kinder und Jugendliche ab 6 Jahren geeignet [74]. Ethanol als Bestandteil der Lösung bringt eine höhere Wirksamkeit mit sich, kann allerdings auch zu einer Schädigung der zellulären Strukturen der Mundschleimhaut und Beschwerden während der Anwendung führen [75-78]. Elektronenmikroskopisch sichtbare Veränderungen der Zellwände unter anderem von *A. actinomycetemcomitans* und *F. nucleatum* waren nach 30 Sekunden Kontakt mit Listerine® zu erkennen [79]. Nach Anwendung der Mundspülung *in situ* wurde ein bakterizider Effekt auf 80% der supragingivalen Plaquebakterien festgestellt [72]. Die mehrmals tägliche Spülung mit Listerine® als alleinige Mundhygienemaßnahme verringerte Plaqueakkumulation und Gingivitisrisiko deutlich stärker als die Spülung mit alkoholischer Trägerlösung [80]. *In vitro* zeigte die alkoholische Trägerlösung einen geringen bakteriziden Effekt, der schwächer ausfiel, als die Formulierung mit ätherischen Ölen [81]. Durch Methylsalicylat besitzt die Mundspüllösung antioxidative Eigenschaften, die einen positiven Einfluss auf die Immunantwort des Wirts bei Gingivitis und Parodontitis haben können [82]. Die Lösung ist nicht nur gegen planktonisch vorliegende, sondern auch gegen im Biofilm organisierte *A. actinomycetemcomitans*-Stämme wirksam [83]. *In vitro* wurde unter

anderem eine Wachstumshemmung auf *S. mutans* und *Lactobacilli* nachgewiesen [21]. In einer Studie von Warnke et al. [84] reagierte *S. mutans* sensitiver auf Thymianöl als auf 0,1% CHX. *A. actinomycetemcomitans* reagierte in einer weiteren Studie sensitiver auf Eukalyptusöl als auf CHX 0,12% [85]. Auch andere ätherische Öle zeigten eine deutlich höhere Wirksamkeit auf *Lactobacilli*, Staphylokokken, Streptokokken und *Candida*-Stämme [84, 85]. Eine Reduktion des Plaque-Indexes, des Gingiva-Indexes und des Sulkusblutungsindexes durch Spülung mit Listerine® während der Behandlung mit MBA konnte bereits beobachtet werden [86, 87]. Auch die alkoholfreie Formulierung Listerine® Zero™ bewirkte klinisch eine signifikante Reduktion der Indizes [88-90].

#### 2.3.4. Grüner Tee

Aus den Blättern der Teepflanze *Camellia sinensis* wird grüner Tee und schwarzer Tee gewonnen. Grüner Tee wird aus getrockneten, nicht-fermentierten Blättern hergestellt und enthält im Vergleich zu anderen Heilpflanzen eine hohe Konzentration an Catechinen und anderen Polyphenolen mit antioxidativer Wirkung [91-95]. Grüner Tee besitzt gesundheitsfördernde, antibakterielle und antimykotische Eigenschaften. Epigallocatechingallat und Epigallocatechin bilden circa zwei Drittel der Catechine im grünen Tee und werden in pharmazeutischen Studien zur Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und malignen Neoplasien getestet [94, 96, 97]. Der Wirkmechanismus der Catechine beruht vermutlich auf einem Angriff und Umbau der Zellwand von Mikroorganismen, wodurch die bakterielle Adhäsion an Oberflächen verhindert wird [97].

Extrakte von grünem Tee, die hauptsächlich Catechine enthielten, zeigten eine bakterizide Wirkung auf kariogene Mikroorganismen, wie *S. mutans*, *Streptokokkus sobrinus* und *Lactobacillus acidophilus* [92, 93, 98-100]. Außerdem wurde *in vitro* eine Sensitivität von *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *S. mutans* gegenüber Grüntee-Extrakt nachgewiesen. Die MHK lag zwischen 3,3 mg/ml für *S. mutans* und 12,5 mg/ml für *P. intermedia* [101]. In einer weiteren *in vitro* Studie von Thomas et. al [21] zeigte grüner Tee eine ähnliche Wachstumshemmung auf *S. mutans*, *Candida albicans* und *Lactobacilli* wie Listerine®. Die Bakterienadhäsion an Zahnhartsubstanz konnte durch Catechine, die eine bakterizide Wirkung auf *P. gingivalis* und *P. intermedia* zeigten, vermindert werden [100, 102]. Auch aromatischen Verbindungen aus grünem Tee, wie zum Beispiel Linalool und Indol,

konnte eine Wirksamkeit gegen *S. mutans* nachgewiesen werden [103, 104]. Der Abbau des Alveolarfortsatzes während einer experimentellen Parodontitis bei Ratten konnte mit polyphenolischen Grüntee-Extrakten verhindert werden [105]. Außerdem wurde die Produktion und Enzymaktivität von Virulenzfaktoren von *P. gingivalis* und *P. intermedia*, wie Cysteinproteinasen und Tyrosinphosphatasen, durch Zugabe von Catechinen aus grünem Tee *in vitro* inhibiert [106-108]. Teeblätter und aufgebrühter grüner Tee enthalten, ähnlich wie Mundspüllösungen, bis zu 330 ppm Fluorid, die zur Kariesprävention beitragen [109, 110]. Klinische Studien mit grünem Tee als Mundspülung konnten einen Rückgang des Plaque- und Gingiva-Indexes, vergleichbar mit CHX verzeichnen [111, 112]. Das Kauen eines Kaugummis mit Grüntee-Extrakt konnte den Sulkusblutungsindex, den approximalen Plaque-Index und die Produktion von Interleukin-1- $\beta$  senken [22].

#### 2.3.5. *Lonicera japonica*

Das japanische Geißblatt, *Lonicera japonica* (*L. japonica*), gehört der Familie der Geißblattgewächse (*Caprifoliaceae*) an. Das natürliche Verbreitungsgebiet liegt in Ostasien und beinhaltet Japan, Korea, China und Taiwan [113]. In der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) findet das Japanische Geißblatt kombiniert mit weiteren pflanzlichen Wirkstoffen verschiedenste Anwendung, unter anderem zur Therapie der Parotitis bei Kindern, Mundtrockenheit, Zahnschmerzen und Entzündungen in der Mundhöhle. In der Regel wird ein Tee aus den Blüten, den Blättern oder einem Extrakt verabreicht [113, 114].

Der Heilpflanze werden antibakterielle, antivirale, anti-inflammatorische und zytoprotektive Eigenschaften zugeschrieben [114-118]. Bei den antibakteriell wirksamen Inhaltsstoffen handelt es sich hauptsächlich um organische Säuren, wie Chlorogensäure und Kaffeesäure, ätherische Öle und Flavonoide [92, 118-120]. Einige dieser Stoffe (insbesondere Chlorogensäuren und Flavonoide) beschleunigen die Wundheilung chronischer Wunden und inhibieren die Freisetzung von Entzündungsmediatoren [115, 116, 121, 122]. Die Extrakte (Ethanol-, Methanol-Extrakt und ätherische Öle) der Pflanze wurden bereits in verschiedenen *in vitro* Studien an unterschiedlichsten Bakterien getestet. Hauptsächlich handelte es sich dabei um Lebensmittelkeime und Enterobakterien. Dabei konnte eine antibakterielle Wirksamkeit festgestellt werden [92, 117, 118, 120]. Eine Inhibition des Wachstums von oralen Pathogenen (*S. mutans*, *P. gingivalis* und *P. intermedia*) zeigte Myricetin,

ein phenolischer Bestandteil von *L. japonica* und anderen Pflanzen aus der TCM [123]. Auch einem alkoholischen Extrakt wurde bereits eine wachstumshemmende Wirkung auf kariogene Streptokokken nachgewiesen [92]. Wässriger Tee-Extrakt zeigte eine bakteriostatische Wirkung auf *P. gingivalis*, aber keine Wirksamkeit gegen *S. mutans* [124].

#### 2.4. Zielsetzung

Da die Nachfrage für pflanzliche Arzneimittel als Alternative zu herkömmlichen stetig ansteigt, stellt sich die Frage nach einer pflanzlichen Mundspüllösung ohne chemische Zusätze, wie Alkohole, Emulgatoren und Konservierungsstoffe, oder unerwünschte Nebenwirkungen, wie Zahnverfärbungen [21, 23]. Bisher gibt es nur wenige *in vitro* Studien, die einen Vergleich der häufig empfohlenen Mundspüllösungen für Kinder und Jugendliche anstellen [21, 64]. Daher ist eine Untersuchung zu deren Wirksamkeit von entscheidender Bedeutung.

Die bisherigen Studien zur antibakteriellen Wirksamkeit von grünem Tee und *Lonicera japonica* an kariogenen und parodontalpathogenen Mikroorganismen zeigen vielversprechende Ergebnisse [21, 92, 93, 98, 124]. Die Untersuchung der wachstumshemmenden Wirkung, speziell auf parodontalpathogene Bakterien, die bei Gingivitis während der Therapie mit MBA isoliert wurden, erscheint sinnvoll. Der *in vitro* Vergleich zwischen den Heilpflanzen und handelsüblichen Mundspüllösungen ist von Relevanz, um die Mundspülung mit *Lonicera japonica* oder grünem Tee als pflanzliche Alternative zur Prävention und Therapie der Gingivitis bei KFO-Patienten einstufen zu können. Japanische Geißblattblüten und grüner Tee scheinen aufgrund ihrer Darreichung in Form eines Tees als Mundspüllösung geeignet.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Arzneimittelpflanzen und Teezubereitung

*Lonicera japonica* Flos, japanische Geißblattblüten, (PZN:4304599) von HerbaSinica GmbH (Rednitzhembach, Deutschland) wurden zur Herstellung eines Tees verwendet. Dazu wurden 20 g der getrockneten Blüten in 100 ml kaltem Wasser für 30 min eingeweicht und anschließend für 5 min aufgeköcht.

Der grüne Tee „Sencha“ – Bio-Grün-Tee (PZN: 10932006) der Firma Weltecke (Alexander Weltecke GmbH, Hamm, Deutschland) besteht aus Blättern der Teepflanze *Camellia sinensis* und stammt aus kontrolliert biologischem Anbau. 20 g getrocknete Teeblätter wurden mit 100 ml 80°C heißem Wasser übergossen. Die Ziehzeit betrug hier ebenfalls 5 min.

Als Alternative zu den losen Teeblättern des Bio-Grün-Tees wurde für die Vorversuche ein handelsüblicher grüner Tee in Teebeuteln von Meßmer (Ostfriesische Tee Gesellschaft GmbH, Seevetal, Deutschland) als Vergleichslösung zubereitet. Ein Teebeutel wurde nach Packungsanleitung mit 200 ml 80°C heißem Wasser übergossen. Die Ziehzeit betrug anschließend 3 min.



Abbildung 2: Grüner Tee „Sencha“ von Weltecke und japanische Geißblattblüten von HerbaSinica

### 3.2. Mundspüllösungen

In Tabelle 2 sind die verwendeten Mundspüllösungen mit Wirkstoffen und weiteren Inhaltsstoffen aufgeführt. Alle Mundspüllösungen sind im Handel erhältlich. Sensodyne® ProSchmelz® (GlaxoSmithKline Consumer Healthcare GmbH, München, Deutschland) und ACT® Anticavity Kids OceanBerry® (Chattem Inc., Chattanooga, USA) enthalten Natriumfluorid als Wirkstoff. Bei ACT® Anticavity Kids OceanBerry® handelt es sich um ein Produkt aus dem US-amerikanischen Handel. Listerine® Zero™ (Johnson & Johnson, Maidenhead, UK) enthält, zusätzlich zu Natriumfluorid, ätherische Öle als aktive Substanzen. Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei (GlaxoSmithKline Consumer Healthcare GmbH & Co. KG, Bühl, Deutschland) mit 0,2% CHX wird als positive Kontrolle verwendet.



Abbildung 3: verwendete Mundspüllösungen (von links: Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei, Sensodyne® ProSchmelz®, ACT® Anticavity Kids Ocean Berry®, Listerine® Zero™)

Tabelle 2: Inhaltsstoffe der verwendeten Mundspüllösungen

<b>Mundspülung</b>	<b>Wirkstoff</b>	<b>weitere Inhaltsstoffe (Funktion)</b>
Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei	0,2 % Chlorhexidinbis- (D-gluconat)	Wasser, Pfefferminzaroma Macroglycerolhydroxystearat (Emulgator) Glycerol, Sorbitol-Lösung (Feuchthaltung/Süßungsmittel)
ACT® Ocean Berry® Anticavity Kids Alcohol Free Fluoride Rinse	500 ppm Natriumfluorid	Wasser, Benzylalkohol (Duft/Aromastoff) Blue 1 (Farbstoff), Flavor Sorbitol, Sucralose (Süßstoffe) Calcium Dinatrium EDTA (Antioxidans) Dinatrium-Phosphat (Säureregulator, Komplexbildner) Poloxamer 407 (Emulgator, schaumdämpfend) Polysorbat 20 (Emulgator) Kalium-Sorbat (Konservierungsmittel) Cetylpyridinium Chlorid (Antiseptikum) Propylene Glycol (schaumdämpfend, antimikrobiell) Natrium-Benzoat (Konservierungsmittel, antibakteriell)
Listerine® Zero™	ätherische Öle: Eucalyptol, Menthol, Methylsalicylat, Thymol  220 ppm Natriumfluorid	Wasser, Aroma, CI42053 (Farbstoff) Natrium-Saccharin, Sucralose, Sorbitol (Süßstoffe) Poloxamer 407 (Emulgator, schaumdämpfend) Natrium Lauryl Sulfate (Tensid, Emulgator, Feuchthaltemittel) Propylenglycol (antimikrobiell, schaumdämpfend) Benzoessäure, Natrium-Benzoat (Konservierungsmittel, antibakteriell)
Sensodyne® ProSchmelz®	450 ppm Natriumfluorid	Wasser, Aroma, CI 42090 (Farbstoff) Glycerin (Feuchthaltung, Süßungsmittel) Sorbitol, Sodium Saccharin (Süßstoffe) Dinatrium-Phosphat, Natrium-Phosphate (Säureregulatoren, Komplexbildner) Cellulose Gum, Xanthan Gum, VP/VA Copolymer (Bindemittel) Poloxamer 338 (Emulgator, schaumdämpfend) PEG-60 Hydrogenated Castor Oil (Rizinusölbasis; Emulgator) Kalium-Nitrat (Konservierungsstoff, reduziert Dentinhypersensibilität) Natrium-Benzoat (Konservierungsmittel, antibakteriell) Methylparaben, Propylparaben (Konservierungsstoff, fungizid) Cetylpyridinium-Chlorid (Antiseptikum)

### 3.3. Mikroorganismen

Die Bakterien stammen vom Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland). Folgende Tabelle zeigt die getesteten Erreger, deren Stoffwechselverhalten und gram-Färbeeigenschaften.

Tabelle 3: verwendete Bakterienstämme mit Eigenschaften

<b>Name</b>	<b>Gram-Färbung</b>	<b>Stoffwechselverhalten</b>	<b>DSM Nr.</b>
<i>Actinomyces israelii</i>	positiv	anaerob	43011
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	negativ	fakultativ anaerob	8324
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	negativ	anaerob	15643
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	negativ	anaerob	20709
<i>Prevotella intermedia</i>	negativ	anaerob	20706
<i>Streptococcus mutans</i>	positiv	fakultativ anaerob	20523

### 3.4. Nährmedien

In Tabelle 4 sind die Flüssignährmedien für die verschiedenen Mikroorganismen und deren Zusammensetzung aufgeführt.

Tabelle 4: Kulturmedien der Keime gemäß den Richtlinien und Anleitungen der DSMZ [125-127]

<b>Stamm</b>	<b>Medium</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
<i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>S. mutans</i>	Trypton-Soja-Hefeextrakt-Medium (92)	Trypton-Soja-Bouillon 30 g, Hefeextrakt 3 g, destilliertes Wasser 1000 ml pH: 7,0-7,2
<i>A. israelii</i> <i>F. nucleatum</i>	Hefeextrakt-Pepton-Glucose-Medium (modifiziert) (104)	Trypton 5 g, Pepton 5 g, Hefeextrakt 10 g, Rindfleischextrakt 5 g, Glucose 5 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 g, Tween 80 1ml, Cystein-HCl x H <sub>2</sub> O 0,5 g, Resazurin 1 mg, Salz-Lösung 40 ml, Destilliertes Wasser 950 ml, Hämin-Lösung 10 ml, Vitamin K1-Lösung 0,2 ml pH: 7,2
<i>P. gingivalis</i>	Medium mit gehacktem Fleisch und Kohlenhydraten (110) + Hämin und Vitamin K3	Rinderhack (fettfrei) 500 g, destilliertes Wasser 1000 ml, NaOH 1 N 25 ml, Casitone 30 g, Hefeextrakt 5 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5g, Na-Resazurin-Lösung (0.1% w/v) 0,5 ml, D-Glucose 4 g, Cellobiose 1 g, Maltose 1 g, Stärke 1 g, Hämin-Lösung 10 ml, Vitamin K3-Lösung 10 ml pH: 7,0
<i>P. intermedia</i>	Hefeextrakt-Pepton-Glucose-Medium (modifiziert) (104) + 5% Pferdeserum	Trypton 5 g, Pepton 5 g, Hefeextrakt 10 g, Rindfleischextrakt 5 g, Glucose 5 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 g, Tween 80 1ml, Cystein-HCl x H <sub>2</sub> O 0,5 g, Resazurin 1 mg, Salz-Lösung 40 ml, destilliertes Wasser 950 ml, Hämin-Lösung 10ml, Vitamin K1-Lösung 0,2ml, Pferdeserum 5% pH: 7,2

### 3.5. Versuchsprinzip

Beim Agardiffusionstest wird eine Bakteriensuspension gleichmäßig auf eine Agarplatte aufgebracht. Anschließend wird ein mit einem Pharmakon beschicktes Testblättchen auf die Agarplatte aufgelegt. Während der Inkubation diffundiert das Pharmakon in die Peripherie und bildet einen Konzentrationsgradienten um das Blättchen. Gleichzeitig bildet sich ein Bakterienrasen auf der Agarplatte. Je sensibler das Bakterium auf das jeweilige Pharmakon reagiert, desto größer ist die Fläche rund um das Blättchen, die nicht mit Bakterienkolonien bewachsen ist, der sogenannte Hemmhof. Der Durchmesser des Hemmhofes ist daher ein Maß für die Diffusion und die Wirksamkeit eines Pharmakons auf einen bestimmten Erreger.

### 3.6. Vorversuche

Aufgrund der leichteren Anzucht und Handhabung wurden die Vorversuche mit *S. mutans* und *A. actinomycetemcomitans* durchgeführt. Die Kultivierung der Mikroorganismen wurde, wie für den Hauptversuch nachfolgend beschrieben, durchgeführt. Da die Verarbeitung und Eignung der Teelösungen für die Versuche im Vordergrund standen, wurde während der Vorversuche, von den oben genannten Mundspüllösungen nur Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei als Kontrolle mitgeführt.

Die Teelösungen wurden nach Packungsanleitung, wie bereits erläutert, zubereitet. Um die Ziehzeit einzuhalten, wurde der Tee nach 5 min durch ein grobes Teesieb filtriert. Der Teebeutel von „Meßmer Grüner Tee“ wurde nach 3 min aus der Lösung entfernt.

Anschließend erfolgte die Beimpfung von Columbia Agarplatten mit 5% Schafblut (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) durch gleichmäßiges Ausspateln der Bakteriensuspension. Die Zusammensetzung der Agarplatten ist wie folgt: pankreatisch abgebautes Casein, peptisch abgebautes Tiergewebe, Hefeextrakt, Rindfleischextrakt, Maisstärke, Natriumchlorid, Agar, defibriertes Schafblut. Dabei wurden zwei Platten mit *S. mutans* und zwei weitere Platten mit *A. actinomycetemcomitans* beschickt. Jeweils eine der beimpften Platten wurde mit vier sterilen Celluloseblättchen (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) bestückt. Auf die Blättchen wurden mit einer Eppendorf-Pipette je 20 µl einer Teelösung, als positive Kontrolle 20 µl Chlorhexamed® forte 0,2% alkoholfrei und als

Negativkontrolle 20 µl steriles destilliertes Wasser aufgebracht. Die beiden zusätzlichen Agarplatten wurden als Wachstumskontrolle der Mikroorganismen ohne Celluloseblättchen mitgeführt. Alle vier Agarplatten wurden in einen Anaerobier-Topf von Oxoid™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) eingebracht, mit Anaerocult®-A (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) bestückt und bei 37°C für 48 h in einem Inkubator (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) bebrütet.

Nach 48 h war kein Ablesen der Ergebnisse auf den Agarplatten mit den Celluloseblättchen möglich, da die Kulturen von *S. mutans* und *A. actinomycetemcomitans* von aeroben Sporenbildnern überwachsen wurden. Auf den Agarplatten ohne Testlösungen war ein gleichmäßiger Bakterienrasen zu erkennen. Da die Sporenbildner höchstwahrscheinlich aus den Teelösungen stammten, wurde eine Sterilisation der Tees notwendig, um die Tests durchführen zu können.

Als Sterilisationsmöglichkeiten wurden Heißluftsterilisation, Autoklavierung und Sterilfiltration in Betracht gezogen.

Die Heißluftsterilisation führte zu verbranntem Teepulver und bräunlich verfärbten, stark getrübbten Teelösungen, die nicht zu Versuchszwecken verwendet werden konnten, da durch teilweises Verdampfen eine Änderung der Konzentration stattgefunden hatte und eine Zerstörung der Inhaltsstoffe durch die erkennbare Verbrennung und Farbänderung nicht ausgeschlossen werden konnte.

Die Autoklavierung gestaltete sich ebenfalls schwierig. Die Teepflanzen waren ähnlich verfärbt und teilweise zerfallen, wie nach der Heißluftsterilisation. Das Autoklavieren der Teelösungen hatte auch zur Folge, dass teilweise Flüssigkeit aus den nicht vollständig verschlossenen Behältern verdampfte, was zu einer nicht definierbaren Änderung der Konzentration führte. Außerdem konnte nicht sichergestellt werden, dass die Temperatur im Inneren der Flüssigkeit hoch genug war, um eine vollständige Sterilisation und Zerstörung der Sporenbildner zu garantieren.

Die Sterilfiltration wurde mit Sartorius Stedim Biotech-Ministart® single use filter units Porengröße 0,2 µm (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Das Filtrat wurde in sterile Glasbehälter gefüllt und luftdicht verschlossen. Verfärbungen und Trübungen fanden in diesem Fall nicht statt. Durch die Wahl der Porengröße wurde sichergestellt, dass Sporenbildner oder andere Mikroorganismen nicht in das Filtrat übertragen werden. Durch kleine Pflanzenteile in den Teelösungen war ein häufiges Wechseln der Filtereinheiten notwendig, um ausreichend Filtrat zu erhalten.

Nach allen drei Sterilisationsverfahren wurde ein Ausstrich der Teelösungen auf Columbia-Agar für 48 h bei 37°C bebrütet, um erneutes Wachstum von anaeroben Sporenbildnern in den folgenden Versuchen auszuschließen. Auf den Agarplatten war kein bakterielles Wachstum nach der Bebrütung zu erkennen. Für die weiteren Versuche wurden die Teelösungen nach der Ziehzeit durch Sterilfiltration vorbereitet, da dies die schonendste Art war, die weder zu erneutem Aufkochen und Verdampfen noch zu einer Verfärbung der Lösungen geführt hatte.

Nach Sterilfiltration der Teelösungen wurde der Agardiffusionstest erneut mit *S. mutans* und *A. actinomycetemcomitans* durchgeführt. Als Kontrollen wurden steriles destilliertes Wasser und Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfreimitgeführt. Nach 48 h Inkubation bei 37°C war bei dem grünen Tee „Sencha“ von Weltecke eine Wachstumshemmung von *S. mutans* um das Celluloseblättchen zu erkennen (Abbildung 4). *L. japonica* und der grüne Tee von Meßmer zeigten keine Wachstumshemmung der Mikroorganismen (Abbildung 5). Das Celluloseblättchen mit sterilem destilliertem Wasser als Negativkontrolle war ebenfalls von keinem Hemmhof umgeben. Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei erzeugte den größten Hemmhofdurchmesser. Bei diesem Versuch war keine der Agarplatten mit anderen Mikroorganismen verunreinigt (Abbildungen 4 und 5).

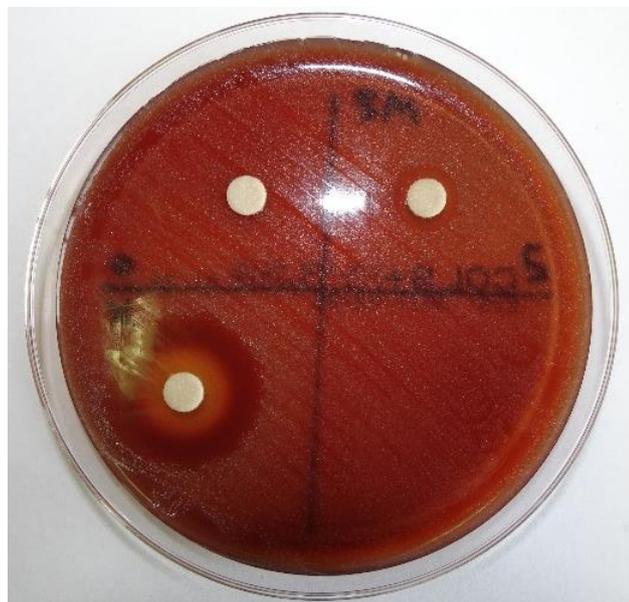


Abbildung 4: Beimpfte Agarplatten mit Grüner Tee „Sencha“ (oben rechts) mit dest. Wasser (oben links) und Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei (unten links) auf *S. mutans*

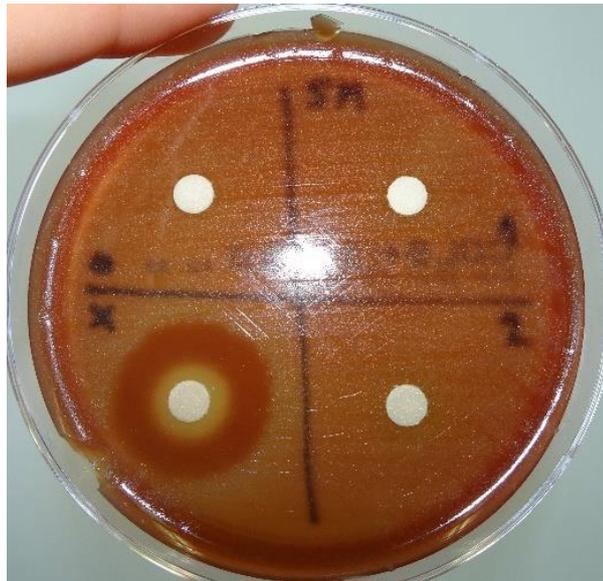


Abbildung 5: Beimpfte Agarplatten mit *L. japonica* (oben rechts) und Grüner Tee Meißner (unten rechts) mit sterilem dest. Wasser (oben links) und Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei (unten links) auf *S. mutans*

Um eine zu niedrige Konzentration der Teelösungen als Ursache für die teilweise fehlende oder nur schwache Wirkung auszuschließen, wurde ein neuer Versuchsansatz mit verlängerter Ziehzeit durchgeführt. Hierfür wurden die Lösungen angesetzt und 6 Stunden bei ca. 80°C aufgebrüht. Als Vergleich wurden erneut Tees unter den vorherigen Bedingungen zubereitet. Anschließend erfolgten die Sterilfiltration und der Agardiffusionstest mit Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei und destilliertem Wasser als Kontrolle. Nach 48 h Inkubation bei 37°C konnte kein Unterschied in der Wachstumshemmung zwischen den Tees mit unterschiedlichen Ziehzeiten festgestellt werden. Der grüne Tee aus dem Teebeutel von Meißner zeigte genau wie *L. japonica* weiterhin keine Wirkung.

Für die Durchführung der Hauptversuche mit allen oben genannten Testkeimen und Mundspüllösungen wurde der grüne Tee „Sencha“ von Weltecke ausgewählt und der grüne Tee aus dem Teebeutel von Meißner ausgeschlossen. *L. japonica* wurde in die Hauptversuche aufgenommen, da bereits erfolgreiche Testergebnisse von anderen Autoren an Anaerobiern vorlagen [123, 124]. Die Ziehzeit wurde mit 5 min, wie auf der Packungsanleitung angegeben, beibehalten, um eine tägliche Zubereitung und Anwendbarkeit als Mundspülung zu simulieren.

### 3.7. Kultivierung der Mikroorganismen

Die Hauptversuche wurden mit den folgenden sechs Mikroorganismen aus dem Leibniz-Institut DSMZ durchgeführt (siehe Tabelle 3): *A. actinomycetemcomitans*, *A. israelii*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *S. mutans*. Die Aktivierung der gefriergetrockneten Zellpellets aus den Ampullen der DSMZ erfolgte nach Standardmethoden. Die fakultativ anaeroben Stämme (*A. actinomycetemcomitans* und *S. mutans*) wurden unter einer Werkbank in 0,5 ml des Trypton-Soja-Hefeextrakt-Medium (Tabelle 4) gelöst. Anschließend wurde die Hälfte der Lösung zur Überprüfung der Reinheit der Bakterienkultur auf einer Columbia Agarplatte mit 5% Schafblut (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) ausgestrichen, die andere Hälfte in 5 ml Flüssignährmedium überimpft. Die Bebrütung erfolgte bei 37°C in einem Anaerobier-Topf von Oxoid™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA), der mit einem Teelicht bestückt als Kerzentopf verwendet wurde, um eine CO<sub>2</sub>-Anreicherung und einen O<sub>2</sub>-Abfall zu erreichen. Die Ampullen der anaeroben Stämme (*A. israelii*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *P. intermedia*) wurden in einem Anaerobierzelt (Vinyl Anerobic Chamber von Coy Lab Laboratory Products Inc., Grass Lake, USA) unter einer Formiergas-Atmosphäre von 95% N<sub>2</sub> und 5% H<sub>2</sub> geöffnet und in je 0,5 ml Flüssigmedium (siehe Tabelle 4) gelöst. Anschließend erfolgte ebenfalls der Ausstrich auf Columbia-Agar mit 5% Schafblut und die Überimpfung in 5 ml Flüssignährmedium in Hungate-Röhrchen (Chemglass Life Sciences LLC, Vineland, USA). Die Agarplatten wurden in Beutel mit Anaerocult®A-Päckchen (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingeschweißt und mit den Hungate-Röhrchen bei 37°C inkubiert. Die Reinheit der Stämme konnte nach Inkubation auf den Agarplatten bestätigt werden. Die Bakterienkulturen in den Flüssignährmedien wurden auf 0,5 McFarland Units eingestellt, was einer Zelldichte von ca. 1,5x10<sup>8</sup> Colony Forming Units (CFU) pro Milliliter entspricht.

### 3.8. Durchführung des Agardiffusionstests

Die Durchführung des Agardiffusionstests mit den fakultativ anaeroben Keimen und strikt anaeroben Keimen erfolgte mit den sechs oben genannten Testlösungen im Labor des Leibniz Institutes DSMZ in Braunschweig.

Columbia Agarplatten mit 5% Schafblut (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) wurden mit je einer der Bakteriensuspensionen gleichmäßig benetzt und überschüssige Flüssigkeit abgesaugt. Die Benetzung der Agarplatten mit den fakultativ anaeroben Bakterienkulturen (*S. mutans* und *A. actinomycetemcomitans*) erfolgte unter der Werkbank. Substratblättchen aus 100% unbehandelter Cellulose (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) wurden mit einer Eppendorf-Pipette mit je 20 µl einer der Testlösungen bestückt, auf die getrockneten Agarplatten aufgelegt und mit einer sterilen Pinzette leicht angedrückt. Als Negativkontrolle wurde auf jeder Agarplatte ein Celluloseblättchen mit 20 µl sterilem destilliertem Wasser mitgeführt. Die Agarplatten wurden in einen Anaerobier-Topf von Oxoid™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) eingebracht und ein angezündetes Teelicht daraufgestellt. Anschließend erfolgte der Verschluss des Topfes und nach Erlöschen des Teelichtes die Bebrütung im Inkubator (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) bei 37°C für 48 h. Durch diese Kerzentopf-Methode kann von einer sauerstoffarmen und CO<sub>2</sub>-reichen Atmosphäre für die Bakterienkulturen im Anaerobier-Topf ausgegangen werden.

Für die strikt anaeroben Mikroorganismen (*A. israelii*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *P. intermedia*) wurde die Benetzung der Columbia-Agarplatten im Anaerobierzelt (Vinyl Anerobic Chamber von Coy Lab Laboratory Products Inc., Grass Lake, USA) unter Formiergas-Atmosphäre von 95% N<sub>2</sub> und 5% H<sub>2</sub> durchgeführt, um eine Schädigung der Zellen durch zu hohe Sauerstoffzufuhr auszuschließen. Nach Trocknung der Agarplatten wurden hier ebenfalls Celluloseblättchen, welche mit je 20 µl Testlösung bestückt waren, aufgelegt und leicht angedrückt. Eine Negativkontrolle mit 20 µl sterilem destilliertem Wasser wurde mitgeführt. Die Agarplatten mit den anaeroben Mikroorganismen wurden in Beutel mit Anaerocult®A-Päckchen (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingeschweißt, sodass eine anaerobe Atmosphäre während der Inkubation gewährleistet war. Dieser Vorgang musste außerhalb des Anaerobier-Zeltes durchgeführt werden, um ein Platzen der verschweißten Beutel durch Druckdifferenzen bei Ausschleusung zu vermeiden. Die Agarplatten der Anaerobier wurden ebenfalls im Inkubator (Binder GmbH, Tuttlingen,

Deutschland) bei 37°C für 48 h bebrütet. Die Ergebnisse wurden nach 48 h mit einem speziellen Lineal zur Bestimmung von Hemmhofdurchmessern von zwei Personen abgelesen. Alle Hemmhöfe kleiner 7 mm wurden als 0 mm gewertet. Der Versuch wurde für jede der sechs Testlösungen auf allen sechs Bakterienkulturen dreifach angesetzt und durchgeführt.



Abbildung 6: Columbia Agarplatte mit *S. mutans* und vier Celluloseblättchen nach 48 h Bebrütung im Kerzentopf (links: oben steriles destilliertes Wasser, unten Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei; rechts: oben Sensodyne® ProSchmelz®, unten Listerine® Zero™)

### 3.9. Statistische Auswertung

Die deskriptive statistische Auswertung erfolgte mit SPSS (V.23.5 für Windows, IBM Corporation, Armonk, USA). Zur Kontrolle der Dateneingabe wurde die SPSS-Tabelle zu Beginn auf Plausibilität hin überprüft.

Zur Ermittlung von statistisch signifikanten Unterschieden wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit SAS (V.9.4 für Windows, SAS Institute Inc., Cary, USA) Prozedur GLM durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha=5\%$  festgelegt. Post-hoc-Tests für paarweise Vergleiche wurden unter Verwendung der Tukey-Prozedur durchgeführt.

Folgende statistischen Fragestellungen wurden analysiert:

1. Unterschiede zwischen den Mundspüllösungen und Tees bezüglich ihrer Wirkung auf alle getesteten Bakterien und die einzelnen Bakterienstämme
2. Unterschiede in der Empfindlichkeit der einzelnen Stämme
3. Unterschiede zwischen den beiden NaF-Lösungen
4. Einfluss des gram-Färbeverhaltens und Stoffwechselverhaltens auf die Empfindlichkeit der Stämme

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Vergleich der Hemmhofdurchmesser aller Mundspüllösungen

Die Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser der drei Versuchsdurchführungen sind in Abbildung 7 als „x“ dargestellt. Die farbigen Punkte stellen die einzelnen Messwerte der drei Versuchsansätze dar. Bei der Kombination von ACT<sup>®</sup> Anticavity Kids OceanBerry<sup>®</sup> und *F. nucleatum*, sowie bei Listerine<sup>®</sup> Zero<sup>™</sup> und *A. israelii* betrug der Mittelwert 2,3 mm ± 4,04. Die Streuung um den Mittelwert ist in diesen beiden Fällen sehr hoch (SD = 4,04). Grund dafür ist der Durchmesser der Celluloseblättchen von 6 mm, der ein Ablesen des Hemmhofes <7mm verhindert. Die Werte unter 7 mm mussten somit als 0 mm festgelegt werden, was in den beiden genannten Fällen zur ausgeprägten Streuung der Messwerte führte. Die Streuung um den Mittelwert war bei den übrigen Messungen sehr gering (maximale SD = 1,16), was die häufige Überlagerung der farbigen Punkte mit den Mittelwerten zeigt. Es besteht damit eine hohe Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit der Ergebnisse. Die Negativkontrolle mit sterilem destilliertem Wasser zeigte auf allen Agarplatten keine Hemmhöfe um die Celluloseblättchen.

ACT<sup>®</sup> Anticavity Kids OceanBerry<sup>®</sup> zeigte eine wachstumshemmende Wirkung auf alle getesteten Mikroorganismen, außer *F. nucleatum*. Die gemessenen Hemmhofdurchmesser waren auf *F. nucleatum* signifikant geringer ( $p < 0,0005$ ), als die der anderen getesteten Keime und sind aufgrund der großen Streuung nur wenig aussagekräftig. Die Mittelwerte der gemessenen Hemmhofdurchmesser lagen zwischen 2,3 mm (*F. nucleatum*) und 10 mm (*P. intermedia*). Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Hemmung zwischen *A. actinomycetemcomitans* (7 mm), *A. israelii* (8 mm), *P. gingivalis* (8 mm), *P. intermedia* und *S. mutans* ( $p \geq 0,21$ ). Somit scheint die Wachstumshemmung bei fünf der sechs Testkeime ähnlich zu sein.

Chlorhexamed<sup>®</sup> FORTE 0,2% alkoholfrei erzeugte Hemmhofdurchmesser zwischen 12 mm und 26 mm auf allen getesteten Mikroorganismen. Der mittlere Hemmhofdurchmesser von Sensodyne<sup>®</sup> ProSchmelz<sup>®</sup> auf *F. nucleatum* war mit dem von Chlorhexamed<sup>®</sup> FORTE 0,2% alkoholfrei identisch (16 mm;  $p = 1,00$ ). Alle anderen getesteten Keime reagierten signifikant sensitiver auf Chlorhexamed<sup>®</sup> FORTE 0,2% alkoholfrei, als auf die anderen fünf Testsubstanzen ( $p \leq 0,008$ ). Der größte Hemmhofdurchmesser als Reaktion war bei *A. israelii* mit 26 mm festzustellen. Kein signifikanter Unterschied bestand von *A. israelii* zu *P. intermedia*

mit einem Mittelwert von 24 mm Durchmesser ( $p = 0,93$ ). *A. actinomycetemcomitans* zeigte mit durchschnittlich 12 mm die kleinsten Hemmhofdurchmesser bei Kontakt mit Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei.

Eine wachstumshemmende Wirkung des grünen Tees wurde nur auf *S. mutans* gemessen. Der Mittelwert der drei Versuchsansätze lag bei 7,7 mm und zeigte keinen signifikanten Unterschied zu ACT® Anticavity Kids OceanBerry® oder Sensodyne® ProSchmelz® ( $p = 1,00$ ). Listerine® Zero™ ( $p < 0,03$ ) und Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei ( $p < 0,0001$ ) bewirkten signifikant größere Hemmhofdurchmesser bei *S. mutans*. Bei den fünf anderen getesteten Mikroorganismen lag der Hemmhofdurchmesser des grünen Tees bei 0 mm.

Listerine® Zero™ bewirkte eine Wachstumshemmung aller getesteter Keime. Die mittleren Hemmhofdurchmesser lagen zwischen 2,3 mm und 12 mm. Die Hemmhofdurchmesser für *P. intermedia* waren mit 12 mm signifikant größer als für *A. actinomycetemcomitans*, *A. israelii*, *F. nucleatum* und *P. gingivalis* ( $p \leq 0,008$ ). Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen *P. intermedia* und *S. mutans* mit einem Mittelwert von 9,3 mm ( $p = 1,00$ ). Die Messwerte für *A. israelii* sind aufgrund der bereits beschriebenen Streuung nur wenig aussagekräftig. Zwischen den Hemmhöfen von *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* und *P. gingivalis* bestand kein signifikanter Unterschied ( $p = 1,00$ ).

Die Hemmhofdurchmesser der Versuche mit *L. japonica* lagen alle bei 0 mm. Es war kein Unterschied zur Negativkontrolle mit sterilem destilliertem Wasser zu erkennen. Eine Wirkung konnte somit auf kein Bakterium nachgewiesen werden.

Sensodyne® ProSchmelz® führte zu einer Wachstumshemmung bei allen Teststämmen. Die Hemmhofdurchmesser lagen zwischen 8 mm und 16 mm. Die Messwerte bei *F. nucleatum* waren signifikant größer, als bei den anderen fünf Teststämmen ( $p < 0,0001$ ). Zwischen *A. actinomycetemcomitans* mit durchschnittlich 8 mm, *A. israelii* mit 9,3 mm, *P. gingivalis* und *P. intermedia* mit 10 mm und *S. mutans* (8 mm) gab es keine signifikanten Unterschiede ( $p \geq 0,93$ ).

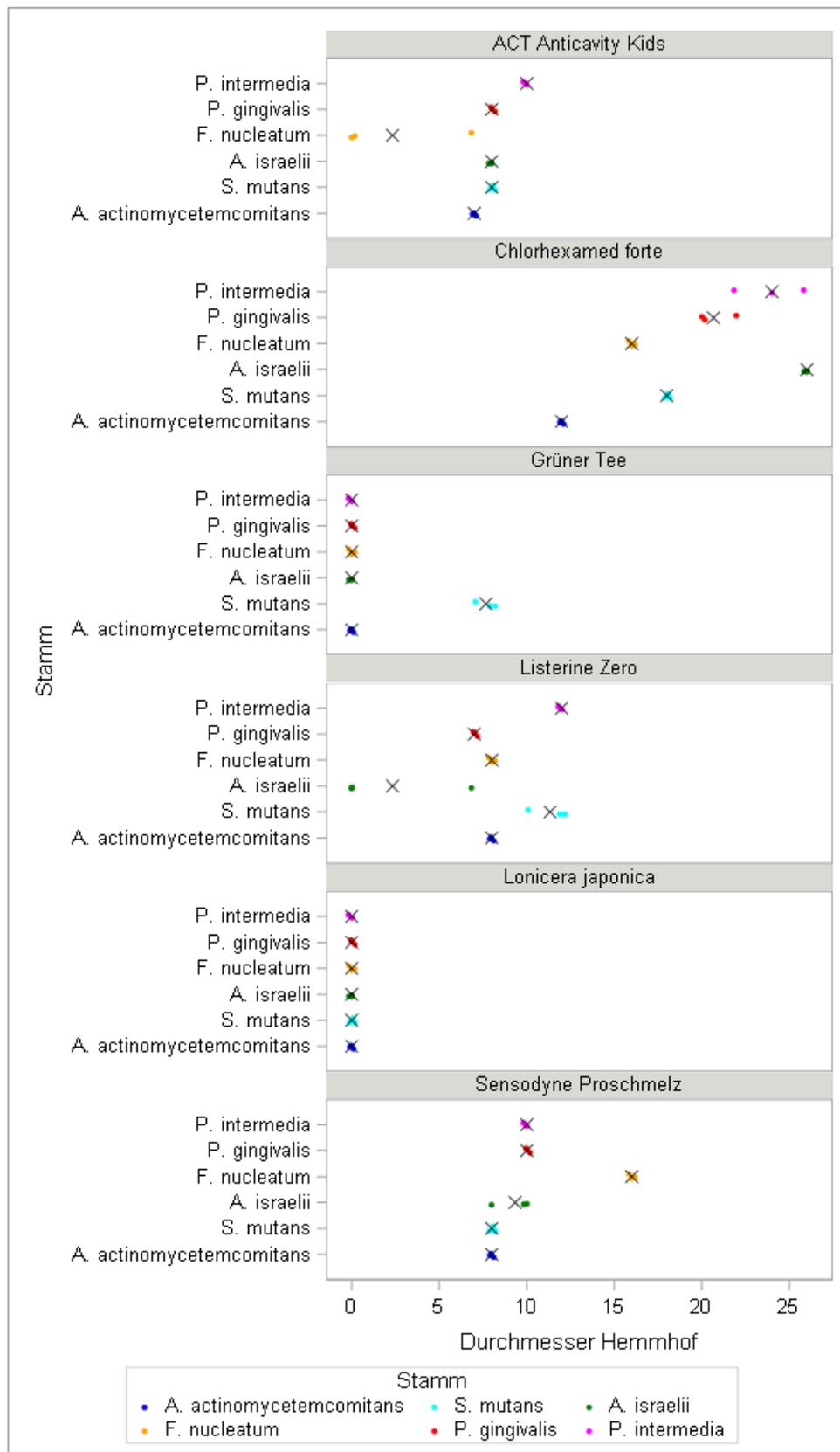


Abbildung 7: Hemmhofdurchmesser für die untersuchten Bakterien (*A. actinomycetemcomitans*, *A. israelii*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *S. mutans*) mit Mittelwerten, sortiert nach den Testlösungen: ACT® Anticavity Kids OceanBerry®, Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei, Grüner Tee, *L. japonica*, Listerine® Zero™ und Sensodyne® ProSchmelz®. Die gemessenen Hemmhofdurchmesser sind als farbige Punkte dargestellt, deren Mittelwerte aus den drei Versuchsansätzen als „x“.

Die Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser der einzelnen Mundspüllösungen auf alle getesteten Bakterien werden in Tabelle 5 dargestellt. Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei zeigte dabei mit einem mittleren Hemmhofdurchmesser von 19,4 mm den höchsten Wert. Der Mittelwert für Sensodyne® ProSchmelz® war der zweithöchste nach Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei und lag bei 10,2 mm. ACT® Anticavity Kids OceanBerry® (Mittelwert: 7,2 mm) und Listerine® Zero™ (Mittelwert: 8,1 mm) erzeugten insgesamt kleinere Hemmhofdurchmesser. Der Mittelwert des grünen Tees ist mit 1,3 mm in der Betrachtung aller Stämme wenig aussagekräftig, da auf fünf der sechs getesteten Bakterien keine Wirkung stattfand.

Tabelle 5: Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser aller getesteten Bakterien aufgeteilt nach den einzelnen Substanzen: ACT® Anticavity Kids OceanBerry® (ACT), Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei (CHX), Grüner Tee (GrT), *L. japonica* (LJ), Listerine® Zero™ (LZ) und Sensodyne® ProSchmelz® (SP)

Substanz	Mittlerer Durchmesser [mm]	95% Konfidenzintervall	
ACT	7,2	6,7	7,7
CHX	19,4	18,9	19,9
GrT	1,3	0,8	1,8
LJ	0,0	-0,5	0,5
LZ	8,1	7,6	8,6
SP	10,2	9,7	10,7

Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse des Tukey post-hoc Tests für die Unterschiede zwischen den Mundspüllösungen.

Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen ACT<sup>®</sup> Anticavity Kids OceanBerry<sup>®</sup> (Mittelwert: 7,2 mm) und Listerine<sup>®</sup> Zero<sup>™</sup> (Mittelwert: 8,1 mm) festgestellt werden ( $p = 0,138$ ). Die Hemmhofdurchmesser von Sensodyne<sup>®</sup> ProSchmelz<sup>®</sup> waren signifikant größer, gemittelt über alle Stämme, als von ACT<sup>®</sup> Anticavity Kids OceanBerry<sup>®</sup> und Listerine<sup>®</sup> Zero<sup>™</sup> ( $p < 0,0001$ ). Chlorhexamed<sup>®</sup> FORTE 0,2% alkoholfrei hatte eine signifikant höhere Wirksamkeit als alle anderen Testsubstanzen ( $p < 0,0001$ ). Trotz des geringen Mittelwertes des grünen Tees war ein signifikanter Unterschied zu *L. japonica* zu verzeichnen ( $p = 0,0076$ ).

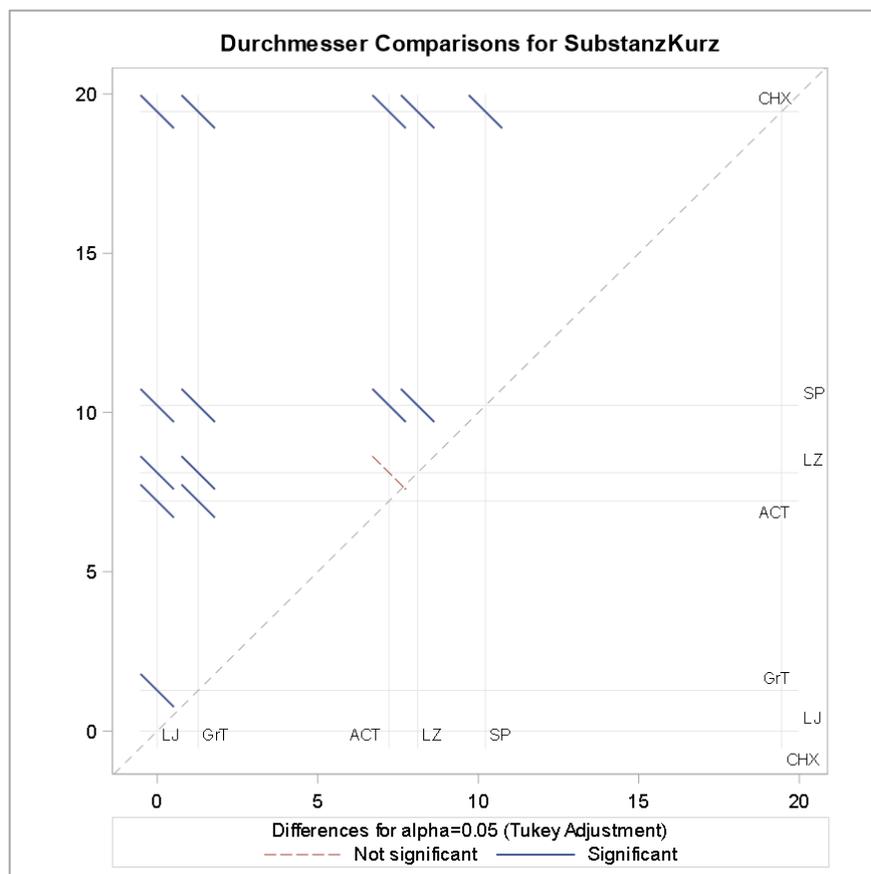


Abbildung 8: Darstellung der Ergebnisse des Tukey Post-Hoc-Tests ( $\alpha = 0,05$ ) für den Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Substanzen: ACT<sup>®</sup> Anticavity Kids OceanBerry<sup>®</sup> (ACT), Chlorhexamed<sup>®</sup> FORTE 0,2% alkoholfrei (CHX), Grüner Tee (GrT), *L. japonica* (LJ), Listerine<sup>®</sup> Zero<sup>™</sup> (LZ) und Sensodyne<sup>®</sup> ProSchmelz<sup>®</sup> (SP). Die signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzen sind als blaue Linien dargestellt.

#### 4.2. Vergleich der Hemmhofdurchmesser der getesteten Bakterien

Tabelle 6 zeigt die durchschnittlichen Hemmhöfe der einzelnen Bakterien, gemittelt über alle getesteten Substanzen. *A. actinomycetemcomitans* zeigte dabei die geringsten Hemmhofdurchmesser (Mittelwert 5,8 mm). Die Mittelwerte von *A. israelii* (7,6 mm), *F. nucleatum* (7,1 mm) und *P. gingivalis* (7,6 mm) liegen nah beieinander. *P. intermedia* (Mittelwert 9,3 mm) und *S. mutans* (Mittelwert 8,8 mm) zeigten die größten Hemmhofdurchmesser und damit die höchste Sensibilität gegenüber den Testsubstanzen.

Tabelle 6: Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser aller Substanzen aufgeteilt nach den einzelnen Bakterien: *A. actinomycetemcomitans*, *A. israelii*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *S. mutans*

Stamm	Mittlerer Durchmesser [mm]	95% Konfidenzintervall	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	5,8	5,3	6,3
<i>A. israelii</i>	7,6	7,1	8,1
<i>F. nucleatum</i>	7,0	6,6	7,6
<i>P. gingivalis</i>	7,6	7,1	8,1
<i>P. intermedia</i>	9,3	8,8	9,8
<i>S. mutans</i>	8,8	8,3	9,3

Durch die Varianzanalyse (ANOVA) konnten signifikante Unterschiede in der Empfindlichkeit der verschiedenen Stämme festgestellt werden. In Abbildung 9 sind die signifikanten und nicht signifikanten Unterschiede bei  $p < 0,05$  nach dem Tukey post-hoc Test dargestellt.

*A. actinomycetemcomitans* zeigte die signifikant geringste Sensibilität aller Stämme auf alle getesteten Substanzen ( $p \leq 0,012$ ). Kein Unterschied konnte zwischen der Empfindlichkeit von *A. israelii* und *P. gingivalis* ( $p = 1,00$ ) festgestellt werden. Die Differenz im Mittelwert von *A. israelii* und *P. gingivalis* zu *F. nucleatum* war ebenfalls nicht signifikant ( $p = 0,626$ ). Diese drei Stämme waren signifikant weniger empfindlich als *P. intermedia* ( $p < 0,0001$ ) und *S. mutans* ( $p \leq 0,012$ ), welche die höchste Sensibilität und keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,724$ ) zeigten.

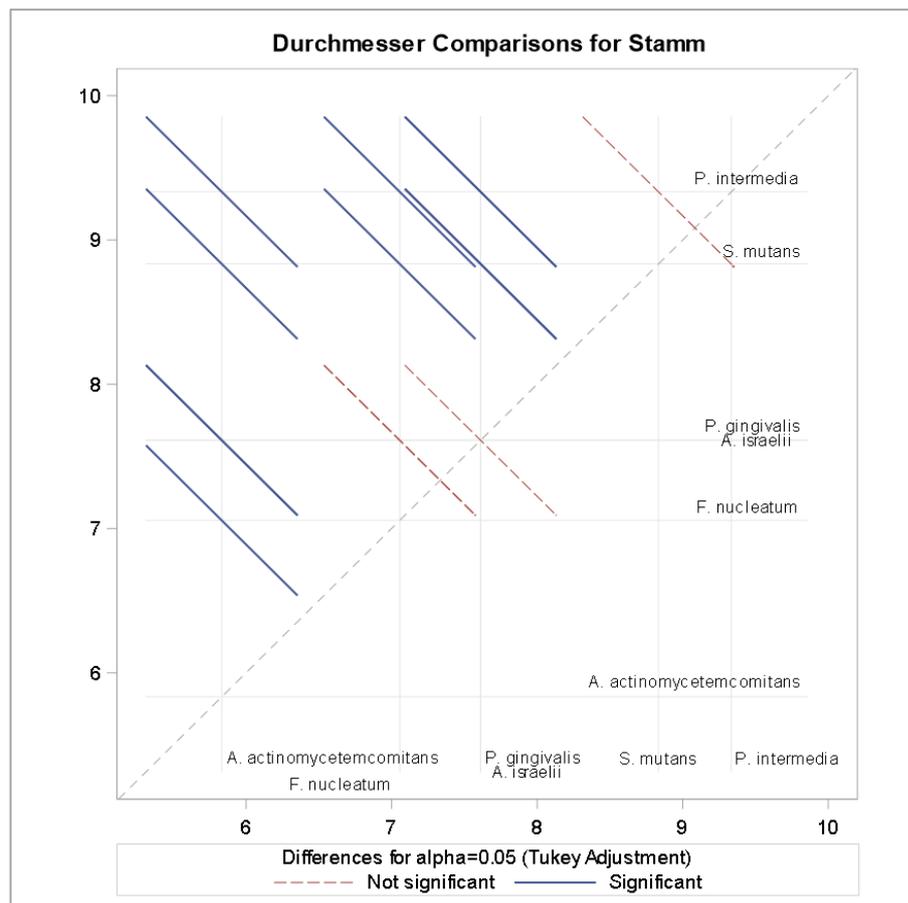


Abbildung 9: Darstellung der Ergebnisse des Tukey Post-Hoc-Tests ( $\alpha = 0,05$ ) für den Vergleich der Mittelwerte der getesteten Bakterien: *A. actinomycetemcomitans*, *A. israelii*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *S. mutans*. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Testkeimen sind als blaue Linien dargestellt.

#### 4.3. Vergleich der NaF-Lösungen

Im direkten Vergleich der NaF-Lösungen waren bei Sensodyne® ProSchmelz® die Hemmhöfe gemittelt über alle Bakterien signifikant größer und die Wirkung damit stärker als bei ACT® Anticavity Kids OceanBerry® ( $p < 0,0001$ ). Bei Betrachtung der einzelnen Stämme, wie in Tabelle 7 dargestellt, war jedoch nur bei *F. nucleatum* ein signifikanter Unterschied festzustellen ( $p < 0,0001$ ). *P. intermedia* und *S. mutans* reagierten mit gleich großen Hemmhofdurchmessern auf ACT® Anticavity Kids OceanBerry® und Sensodyne® ProSchmelz® ( $p = 1,00$ ). Die anderen Mikroorganismen (*A. actinomycetemcomitans*, *A. israelii* und *P. gingivalis*) waren durch Sensodyne® ProSchmelz® tendenziell stärker im Wachstum gehemmt.

Tabelle 7: Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser, Konfidenzintervalle und p-Werte des Vergleichs der Wirkung von ACT® Anticavity Kids OceanBerry® (ACT) und Sensodyne® ProSchmelz® (SP) auf die einzelnen Mikroorganismen

Stamm	Substanz	Mittelwert Hemmhof-durchmesser [mm]	95% Konfidenzintervall		p-Wert für Stamm* Substanz
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	ACT	7,0	5,7	8,2	1,0000
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	SP	8,0	6,7	9,2	
<i>A. israelii</i>	ACT	8,0	6,8	9,2	0,9998
<i>A. israelii</i>	SP	9,3	8,1	10,6	
<i>F. nucleatum</i>	ACT	2,3	1,1	3,6	<0,0001
<i>F. nucleatum</i>	SP	16,0	14,8	17,2	
<i>P. gingivalis</i>	ACT	8,0	6,8	9,2	0,9254
<i>P. gingivalis</i>	SP	10,0	8,8	11,2	
<i>P. intermedia</i>	ACT	10,0	8,8	11,2	1,0000
<i>P. intermedia</i>	SP	10,0	8,8	11,2	
<i>S. mutans</i>	ACT	8,0	6,8	9,2	1,0000
<i>S. mutans</i>	SP	8,0	6,8	9,2	

#### 4.4. Vergleich des gram-Färbeverhaltens und Stoffwechselerhaltens

Abschließend wurden die Unterschiede der Hemmhofdurchmesser in Abhängigkeit vom gram-Färbeverhalten (grampositiv oder -negativ) und Stoffwechselerhalten (anaerob oder fakultativ anaerob) betrachtet. Da für beide Gruppen eine ungleiche Verteilung im Gesamtkollektiv vorlag und die Standardabweichung in den Gruppen relativ hoch war, wurde auf eine weitergehende statistische Auswertung verzichtet.

Die Mittelwerte für grampositive (8,2 mm) und gramnegative (6,9 mm) Bakterien in Tabelle 8 lassen die Tendenz erkennen, dass die grampositiven Mikroorganismen etwas sensibler auf die Substanzen reagierten.

Tabelle 8: Mittelwerte aller Hemmhofdurchmesser sortiert nach gram-Färbeverhalten der Mikroorganismen

<b>Gram-Färbung</b>	<b>Mittelwert Durchmesser [mm]</b>	<b>95% Konfidenzintervalle</b>	
gramnegativ	6,9	6,3	7,5
grampositiv	8,2	7,5	8,9

Zwischen den Mittelwerten der Anaerobier (7,8mm) und fakultativen Anaerobier (7,3m), dargestellt in Tabelle 9, war nur ein geringer Unterschied zu erkennen. Die anaeroben Mikroorganismen wurden durchschnittlich etwas stärker im Wachstum gehemmt.

Tabelle 9: Mittelwerte aller Hemmhofdurchmesser sortiert nach Stoffwechselerhalten der Mikroorganismen

<b>Stoffwechselverhalten</b>	<b>Mittelwert Durchmesser [mm]</b>	<b>95% Konfidenzintervalle</b>	
anaerob	7,8	7,2	8,4
fakultativ anaerob	7,3	6,6	8,0

## 5. Diskussion der Ergebnisse

### 5.1. Methodendiskussion

In der Literaturübersicht wurde deutlich, dass eine chemische Plaquerreduktion bei KFO-Patienten während der Therapie mit MBA, aufgrund der häufig entwickelten Gingivitis, zusätzlich zur mechanischen Reinigung sinnvoll ist. Mundspüllösungen werden mit verschiedensten Inhaltsstoffen angeboten und scheinen grundsätzlich geeignet. Bisher gibt es wissenschaftlich nur unzureichende Ergebnisse zu den untersuchten Mundspüllösungen bezüglich des Keimspektrums bei Gingivitis während der Behandlung mit MBA. Außerdem gibt es kaum Daten zu wirksamen pflanzlichen Alternativen ohne Zusatzstoffe. Ziel dieser Studie war es daher, die wachstumshemmende Wirkung von handelsüblichen Mundspüllösungen mit der Wirkung von zwei möglichen pflanzlichen Alternativen zu vergleichen.

Die Vorversuche dienten der Methodenentwicklung. Es wurde deutlich, dass die Verwendung der Teelösungen für *in vitro* Versuche nicht ohne Filtration und Sterilisation möglich ist, da sich in Naturprodukten Sporen befinden können, die den späteren Versuch verunreinigen. Durch die notwendige Vorbehandlung der Teelösungen kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass wirksame Bestandteile im Filter zurückbleiben oder durch Autoklavierung zerstört wurden. Die unterschiedlichen Ziehzeiten der Tees wurden aufgrund der einfacheren Handhabung der Keime nur an den fakultativ anaeroben Stämmen *S. mutans* und *A. actinomycetemcomitans* getestet. Da für beide Bakterien bei dreifachem Versuchsansatz kein Unterschied in der Wachstumshemmung zwischen der Ziehzeit von 5 min und 6 h zu erkennen war, wurde der Tee für den Hauptversuch mit allen Teststämmen für 5 min aufgebrüht. Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass eine wachstumshemmende Wirkung auf die anaeroben Mikroorganismen durch die verlängerte Ziehzeit von 6 h messbar gewesen wäre.

In den Hauptversuchen wurde mittels eines Agardiffusionstests die antimikrobielle Wirkung von vier handelsüblichen Mundspüllösungen und zwei Teelösungen an sechs Mikroorganismen geprüft. Der dreifache Versuchsansatz erfolgte am gleichen Tag mit denselben Bakterienkulturen. In den drei Versuchsansätzen sind die Hemmhofdurchmesser für alle sechs Testlösungen sehr gleichmäßig ausgefallen, was die Verlässlichkeit der Ergebnisse zeigt.

Der Agardiffusionstest wurde in Form eines Hemmhoftests durchgeführt, bei dem die Celluloseblättchen mit der jeweiligen Testlösung für 48 h auf der Agarplatte verbleiben. Diese Einwirkzeit ist in Bezug auf Mundspüllösungen kritisch zu betrachten, da die Anwendung einer solchen Spülung in der Mundhöhle selten mehr als eine Minute dauert. Außerdem bleibt hier auch die verdünnende Wirkung des Speichels außer Acht, der die Wirksamkeit von Mundspüllösungen schwächen kann [128]. Zwar wird durch die Diffusion der Testlösungen in die Umgebung der Testblättchen ein Konzentrationsgradient gebildet, dieser ist aber nicht messbar und stark von der Hydrophilie und Interaktion der Mundspülung mit dem Nährboden abhängig. Des Weiteren gestaltet sich das Ablesen der Hemmhofdurchmesser durch die dunkle Farbe der Blutagarplatten eher schwierig. Das Ablesen der Ergebnisse mit dem Lineal stellt eine potenzielle Fehlerquelle dar. Um die Fehler hier möglichst gering zu halten, wurden die Hemmhofdurchmesser von zwei unabhängigen Labormitarbeiter\_innen gemessen. Da der Durchmesser der Celluloseblättchen 6 mm beträgt, ist ein Ablesen von Hemmhöfen < 7 mm nicht möglich. Dies ist der Grund für die hohe Streuung der Messwerte von ACT® Anticavity Kids OceanBerry® auf *F. nucleatum* und Listerine® Zero™ auf *A. israelii*. Schwache Wachstumshemmungen können mit diesem Test nur unzureichend gemessen werden und die Wirksamkeit der Mundspüllösungen wird eher zu gering eingeschätzt. Eine weitere Schwierigkeit im Vergleich mit *in vivo* Situationen ist die Durchführung der Versuche mit monomikrobiellen Kulturen. Durch ihre Organisation in Plaque-Biofilmen sind die Bakterien in der Mundhöhle wesentlich besser vor dem Kontakt mit Mundspüllösungen geschützt, als bei der direkten Benetzung auf der Agarplatte [26]. Es kann davon ausgegangen werden, dass die wachstumshemmende Wirkung *in vivo* schwächer ist, als die Testergebnisse erwarten lassen. Das monomikrobielle Modell wurde ausgewählt, da es zuerst einmal um die grundsätzliche Frage der Wirksamkeit ging und monomikrobielle Kulturen leichter reproduzierbar sind, um mehrfache Tests unter gleichen Bedingungen durchführen zu können.

## 5.2. Ergebnisdiskussion

Die Hemmhofdurchmesser aller Testlösungen außer CHX sind eher gering ausgefallen. Dies kann am Diffusionsverhalten der Lösungen liegen, zeigt aber auch eine schwächere Wirksamkeit der handelsüblichen Mundspüllösungen und Tees im Vergleich zu CHX. Da in der Mundhöhle von einer raschen Verdünnung der Lösungen durch Speichel auszugehen ist, ist die wachstumshemmende antimikrobielle Wirkung aller Lösungen außer CHX *in vivo* eher kritisch zu betrachten. In einer Studie von Thomas et al. [21] wurden in einem Agardiffusionstest an *S. mutans* und *Lactobacilli* ähnliche Mundspüllösungen getestet. CHX 0,2% stellte sich mit einem Hemmhofdurchmesser auf *S. mutans* von 18,7 mm als wirksamstes Agens, im Vergleich zu NaF (12,8 mm), grünem Tee (10,8 mm) und Fluorid mit ätherischen Ölen (8,8 mm) heraus. Der Wert von CHX ist vergleichbar mit dem in der vorliegenden Untersuchung (18 mm). Die Reihenfolge der anderen Testlösungen stellte sich etwas anders dar: Fluorid mit ätherischen Ölen erzeugte größere Hemmhöfe auf *S. mutans* (11,3 mm), als die NaF-Lösungen (8 mm) und grüner Tee (7,7 mm). Diese Abweichungen sind vermutlich auf die Verwendung von anderen Nährböden, verschiedenen Fluoridlösungen und auf Unterschiede in der Versuchsdurchführung zurückzuführen, wie die Differenz der aufgetragenen Volumina der Testsubstanzen (50µl anstatt 20µl) und die Bohrung von Mulden in die Agarplatten anstatt der Verwendung von Celluloseblättchen als Träger.

### *Teelösungen*

Die fehlende Wirksamkeit des *L. japonica* Tees und das ebenfalls eher schwache Ergebnis des grünen Tees, der lediglich auf *S. mutans* einen mittleren Hemmhofdurchmesser von 7,67 mm erzeugte, könnten durch die Sterilfiltration mit verursacht worden sein. Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass wirksame Bestandteile im Filter zurückgeblieben sind. Eine weitere mögliche Ursache stellt die Zubereitung mit Wasser dar. Wong et. al konnten in einem Agardiffusionstest mit einem wässrigen Extrakt von *L. japonica* allerdings eine schwache Wirksamkeit auf *P. gingivalis* nachweisen, *S. mutans* wurde auch in dieser Studie nicht im Wachstum gehemmt [124]. Das abweichende Ergebnis könnte an der längeren Ziehzeit liegen, die in den Vorversuchen der vorliegenden Untersuchung an *S. mutans* und *A. actinomycetemcomitans* aber keinen Unterschied zeigte. Araghizadeh et al. [101] stellten einen Grüntee-Extrakt durch Lösung in Ethylacetat,

Gefriertrocknung und anschließender Salzlösung mit Phosphatpuffer her. *S. mutans*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* und *P. gingivalis* zeigten eine Empfindlichkeit. Hier ist davon auszugehen, dass andere Stoffe oder eine höhere Wirkstoffmenge aus den Pflanzenbestandteilen extrahiert wurden, als bei Lösung in reinem destilliertem Wasser. *S. mutans* reagierte sensitiver auf den Extrakt als die gramnegativen Bakterien, was den Ergebnissen dieser Studie ähnelt. Auch Kubo et al. [103] stellten eine höhere Empfindlichkeit von *S. mutans* auf Inhaltsstoffe von grünem Tee, im Vergleich zu gramnegativen Mikroorganismen, fest. In einer weiteren *in vitro* Studie von Tsai et al. [92] wurden die Teeblätter von grünem Tee und *L. japonica* in Methanol gelöst, konzentriert und der hergestellte Extrakt gefriergetrocknet. Eine wachstumshemmende Wirkung konnte in dieser Studie nur auf *Streptokokkus sanguinis*, nicht aber auf *S. mutans*, festgestellt werden. Die Studien von Tsai et al. [92] und Araghizadeh et al. [101] unterscheiden sich nicht nur in der Extrakterstellung, sondern auch in den angewandten mikrobiologischen Methoden von der vorliegenden Untersuchung. In beiden Studien wurde die Mikrodilutionsmethode verwendet, um die MHK für die getesteten Stämme zu bestimmen. Diese Methode ist unabhängig von der Diffusion des Tees in die Peripherie, was zu besseren Testergebnissen führen kann. Tsai et al. [92] konnten außerdem feststellen, dass grüner Tee einen wesentlich höheren Anteil an Phenolen enthält als *L. japonica*, was die schlechtere Wirksamkeit von *L. japonica* erklären könnte. Eine direkte Nutzung der Methanol- und Ethylacetat-Extrakte als Mundspüllösung ist aufgrund der Lösungsmittel schwierig. Unser Ziel war es Lösungen zu testen, die für den Patienten leicht herzustellen oder im Handel erhältlich sind. Bei Sakanaka et al. [108] und Okamoto et al. [106, 107] wurden einzelne Catechine in Reinform für die Versuche verwendet, die vorher aus grünem Tee extrahiert wurden, um die Wirkstoffkonzentration genau festlegen zu können. In allen drei Studien zeigten die Catechine eine inhibitorische Wirkung auf Virulenzfaktoren von *P. gingivalis* und *P. intermedia*. Um die Wirkstoffkonzentration und qualitative Zusammensetzung der Teelösungen vergleichen zu können, wäre eine Untersuchung der Inhaltsstoffe, der in der vorliegenden Studie verwendeten Lösungen, sinnvoll. Tehrani et al. [99] verwendeten in ihrer klinischen Studie bei Kindern einen alkoholischen, mit Wasser verdünnten Grüntee-Extrakt, der die Anzahl von *S. mutans* und *Lactobacilli* im Speichel signifikant verringerte. Im Vergleich zu NaF konnte kein Unterschied gemessen werden. Eine Placebogruppe existierte nicht. Diese Ergebnisse stimmen mit der vorliegenden Studie überein. Hier waren die

Hemmhofdurchmesser von NaF-Lösungen und grünem Tee bei *S. mutans* ebenfalls vergleichbar. Hambire et al. [112] konnten klinisch eine vergleichbare Wirkung von grünem Tee und CHX zeigen. Der Tee wurde in dieser Studie mit Mineralwasser aufgebrüht. Der Effekt kann zum einen an der relativ kurzen Beobachtungszeit von zwei Wochen liegen, zum anderen ist auch ein Placeboeffekt möglich, da in allen Versuchsgruppen ein schneller Rückgang der Indizes zu beobachten war. Balappanavar et al. [111] und Biswas et al. [23] erzielten klinisch sogar einen besseren Plaque-Index und Gingiva-Index durch Spülung mit grünem Tee, als durch CHX. Auch hier betrug die Beobachtungszeit nur drei Wochen und ein Placeboeffekt ist möglich. Für den klinischen Erfolg kann auch eine Hemmung der Adhärenz der Bakterien an Zahnoberflächen und Mukosa oder eine antioxidative Wirkung auf das Gingivaepithel verantwortlich sein. Beide Effekte wurden bereits in Studien mit grünem Tee nachgewiesen [100, 102, 105]. Der Hawthorne-Effekt kann ebenfalls bei klinischen Studien eine Rolle spielen. Er besagt, dass Personen, die wissentlich unter Beobachtung stehen, eine bessere Leistung erbringen [129, 130]. Die Verbesserung der Mundhygiene und der Rückgang der Gingivitis liegt also vermutlich auch an der besseren Mitarbeit der Patienten. Da grüner Tee und vor allem die Grüntee-Extrakte in den genannten *in vitro* und *in vivo* Studien besser abgeschnitten haben, als in der vorliegenden Untersuchung, sollten weitere Tests durchgeführt werden und die Präparation einer pflanzlichen Mundspüllösung aus Grüntee-Extrakt ohne Zusatzstoffe in Erwägung gezogen werden. Zu *L. japonica* als Mundspüllösung sind bisher keine klinischen Studien veröffentlicht worden. Weiterführende Untersuchungen zur Wirksamkeit *in vivo* und *in vitro* sind hier sinnvoll.

### *Chlorhexamed*

Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei (CHX) zeigte die stärkste antibakterielle Wirksamkeit gegen alle getesteten Keime. Der Hemmhofdurchmesser war bei fast allen Tests deutlich größer als der der anderen Testlösungen. Lediglich *F. nucleatum* zeigte die gleiche Sensitivität gegenüber Sensodyne® ProSchmelz® und Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei. Die Empfehlung als Goldstandard in der therapeutischen Anwendung bei Gingivitis und Parodontitis hat sich in dieser Studie bestätigt. In einem Mikrodilutionstest von Botelho et al. [131] zeigte CHX ebenfalls eine wachstumshemmende Wirkung auf *S. mutans*, weitere Streptokokken,

Actinomyzeten und *Lactobacilli*. Stanley et al. [63] haben neben kariogenen auch parodontalpathogene Bakterien in einem Agardiffusionstest zur Bestimmung der MHK von CHX untersucht und sind zu dem Ergebnis gekommen, dass *S. mutans* sensitiver auf CHX reagiert als die parodontalpathogenen Keime, was nicht mit den vorliegenden Ergebnissen übereinstimmt. Der Grund hierfür könnte der Versuchsansatz mit verschiedenen CHX-Konzentrationen, anderen Nährböden und die Auswertung als MHK und nicht als Hemmhofdurchmesser sein. Wong et al. [124] verwendeten CHX als Kontrolle bei einem Agardiffusionstest im Vergleich zu Pflanzen aus der TCM, unter anderem auch *L. japonica*. Die Sensibilität von *S. mutans* auf 0,2% CHX war mit einem Hemmhofdurchmesser von 12,1 mm deutlich geringer, die von *P. gingivalis* mit 23,7 mm etwas höher, als in der vorliegenden Studie (*S. mutans*: 18 mm, *P. gingivalis*: 20,7 mm). Wong et al. [124] bestückten die Testplättchen mit 10 µl anstatt 20 µl CHX und verwendeten eine andere CHX-Lösung, was die abweichenden Hemmhofdurchmesser erklären könnte. Gehlen et al. [61] verzeichneten einen starken Rückgang von *S. mutans* im Speichel durch Spülung mit CHX, der durch Spülung mit NaF nicht zu erreichen war. Außerdem konnte auch fünf Tage nach Absetzen der CHX-Spülung kein Anstieg der Streptokokken gemessen werden. Von Haffajee et al. [132] wurden für CHX im Agardiffusionstest deutlich kleinere MHKs gemessen als für Listerine® Cool Mint. Diese Ergebnisse decken sich mit der vorliegenden Untersuchung, da die NaF-Lösungen und Listerine® Zero™ eine wesentlich schlechtere Wachstumshemmung als Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei zeigten. In klinischen Studien von Biswas et al. [23], Maruniak et al. [52] und Singh et al. [133] war CHX wirksamer bei Patienten mit Gingivitis als Listerine®, was sich ebenfalls mit den Ergebnissen dieser Studie deckt. Anderson et al. [60] und Brightman et al. [7] konnten einen Rückgang des Plaque-Index, Gingiva-Index und der Sondierungstiefen bei KFO-Patienten durch Spülung mit CHX messen. Leichte Verfärbungen der Zähne im Vergleich zur Placebolösung traten ebenfalls auf. Trotz der Bestätigung von CHX als Goldstandard *in vitro*, sollte aufgrund der möglichen Nebenwirkungen von einem Einsatz als dauerhaftes Therapeutikum abgesehen werden [18, 20, 56, 58, 60, 62].

### *Fluoride*

Die Mundspüllösungen mit Natriumfluorid als Wirkstoff bewirkten ebenfalls eine Wachstumshemmung von allen getesteten Keimen. Obwohl ACT® Anticavity Kids

OceanBerry® einen um 50 ppm höheren Anteil an NaF aufweist als Sensodyne® ProSchmelz®, waren die mittleren Hemmhofdurchmesser bei *A. actinomycetemcomitans*, *A. israelii*, *F. nucleatum* und *P. gingivalis* geringer. Ein signifikanter Unterschied war nur bei *F. nucleatum* (ACT® Anticavity Kids OceanBerry® Mittelwert = 2,3 mm, Sensodyne® ProSchmelz® Mittelwert = 16 mm,  $p < 0,0001$ ) zu messen. Die Wachstumshemmung von *S. mutans* (8 mm) und *P. intermedia* (10 mm) war bei beiden NaF-Lösungen identisch. Bei Vergleich der Mittelwerte der Hemmhöfe aller getesteten Stämme war eine signifikant höhere Wachstumshemmung von Sensodyne® ProSchmelz® mit 10,2 mm zu 7,2 mm von ACT® Anticavity Kids OceanBerry® zu verzeichnen. Aufgrund der Wirkstoffkonzentration wäre ein umgekehrtes Ergebnis zu erwarten gewesen. Für den Effekt von Sensodyne® ProSchmelz® scheinen neben dem Wirkstoff NaF auch die weiteren Inhaltsstoffe verantwortlich zu sein. Vor allem Cetylpyridinium-Chlorid (CPC) ist als Antiseptikum in Mundspüllösungen bereits getestet worden. Botelho et al. [131] konnten in einem Mikrodilutionstest keinen Unterschied zwischen CHX und CPC auf *S. mutans* feststellen. Yates et al. [69] zeigten in einer klinischen Studie, dass die Spülung mit einer Lösung aus NaF und CPC den Plaque-Index signifikant verringern kann. Allerdings war auch ein signifikanter Rückgang des Plaque-Index in der Kontrollgruppe zu messen. Für dieses Ergebnis sind vermutlich erneut Placebo- und Hawthorne-Effekt verantwortlich. Da die Lösung von ACT® Anticavity Kids OceanBerry® ebenfalls CPC enthält, ist entweder von verschiedenen CPC-Konzentrationen in den Lösungen auszugehen oder weitere Zusatzstoffe in Sensodyne® ProSchmelz®, wie Parabene und Natriumbenzoat, sind mitverantwortlich für die antimikrobielle Wirksamkeit. Mengel et al. [67] konnten die Wirksamkeit von einer Lösung mit AmF und SnF und einer NaF-Lösung in einer 9-monatigen Studie an Patienten mit chronischer Gingivitis, ohne signifikanten Unterschied zwischen den Mundspüllösungen, unter Beweis stellen. Mikrobiologisch war die Zahl der pathogenen Keime in der supragingivalen Plaque durch AmF und SnF stärker verringert. Ogaard et al. [68] kamen zu einem ähnlichen klinischen Ergebnis beim Vergleich der verschiedenen Fluoridlösungen an Patienten mit MBA. Neben der positiven Wirkung auf die Gingiva der Patienten, konnte durch die Fluoridlösungen auch die Anzahl der WSL verringert werden. Es ist also von einem positiven Effekt der Mundspüllösungen mit NaF, AmF und SnF während der kieferorthopädischen Therapie auszugehen, der unter anderem auf die Wirksamkeit gegen die in dieser Studie getesteten Mikroorganismen zurückzuführen ist.

## Ätherische Öle

Listerine® Zero™, als Vertreter der Mundspüllösungen mit ätherischen Ölen, zeigte eine wachstumshemmende Wirkung auf alle Testkeime. Die Wirkung auf *A. israelii* war allerdings in nur einem der drei Versuchsansätze schwach messbar. Am sensitivsten reagierten *S. mutans* (Mittelwert 11,3 mm) und *P. intermedia* (Mittelwert 12 mm) auf Listerine® Zero™. Hier war die Wachstumshemmung tendenziell stärker, als die von ACT® Anticavity Kids OceanBerry® und Sensodyne® ProSchmelz® (*S. mutans* 8 mm; *P. intermedia* 10 mm). Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen war die MHK für *S. mutans* von Listerine® im Agardiffusionstest von Akinyele et al. [134] und Demirel et al. [135] höher, als von NaF-Lösungen mit CPC. Grund dafür könnten andere NaF-Lösungen sein, die durch ihre weiteren Inhaltsstoffe oder unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen eine höhere Wirksamkeit besitzen, als die hier getesteten. Botelho et al. [131] konnten in einem Mikrodilutionstest mit Konzentrationen bis zu 64 µg/ml keine Wirksamkeit von Thymol auf Streptokokken, *Lactobacilli* oder Actinomyzeten nachweisen. Karbach et al. [85], Tardugno et al. [71] und Warnke et al. [84] verwendeten reine ätherische Öle, u.a. auch Eucalyptol, Menthol und Thymol, die im Agardiffusionstest häufig besser wirksam waren als CHX 0,12%. Es ist also denkbar, dass die Konzentration der Wirkstoffe in Listerine® Zero™ zu schwach ist, um im Agardiffusionstest bessere antibakterielle Ergebnisse zu zeigen. Auch Vlachoannis et al. [81] kamen zu dem Schluss, dass die Wirkstoffkonzentrationen und die Wirkstoffkombination von Listerine® optimiert werden könnten, um eine höhere Wirksamkeit zu erzielen. Pan et al. [72] und Fine et al. [83] konnten einen bakteriziden Effekt durch Spülung mit Listerine® auf planktonisch und in Biofilm vorliegende Bakterien *in vivo* nachweisen. Die Kontrolle und eine Fluorid-Lösung mit AmF und SnF zeigten schlechtere Ergebnisse. Ähnliche Schlüsse lassen auch die klinischen Studien, teilweise mit KFO-Patienten, zu. Listerine® zeigte im Vergleich zu CHX bei Marchetti et al. [90], Maruniak et al. [52] und Singh et al. [133] eine schlechtere Wirksamkeit, aber im Vergleich zu Kontrolllösungen mit Ethanol oder Hydroalkohol in Studien von Alves et al. [87], Charles et al. [88], Fine et al. [136], Mankodi et al. [80] und Tufekci et al. [86] eine bessere Wirkung. Zusätzlich stellten Marchetti et al. [90] den Vergleich zwischen Listerine® und Listerine® Zero™ an und konnten keinen Unterschied in der klinischen Wirksamkeit feststellen. Im Vergleich zu einer Mundspüllösung mit CPC und NaF

zeigte Listerine® Zero™ bei Cortelli et al. [89] eine höhere Wirksamkeit, was sich nur teilweise mit den Ergebnissen in dieser *in vitro* Studie deckt. Allerdings wurde eine andere NaF-Lösung mit CPC verwendet, als in der vorliegenden Untersuchung. Die wachstumshemmende Wirkung von Listerine® Zero™ war vergleichbar mit ACT® Anticavity Kids OceanBerry® und sogar schlechter als Sensodyne® ProSchmelz®.

### *Sensibilität der getesteten Bakterien*

In dieser Studie zeigte sich die höchste Sensibilität auf die getesteten Substanzen bei *P. intermedia* (9,3 mm) und *S. mutans* (8,8 mm). Die beiden Mikroorganismen unterscheiden sich in Stoffwechselverhalten und gram-Färbeverhalten. Daher sind neben Zellwandaufbau und Sauerstofftoleranz höchstwahrscheinlich auch spezifische zelluläre Mechanismen für die hohe Empfindlichkeit gegenüber den Testsubstanzen verantwortlich. Am wenigsten sensibel, mit den geringsten Hemmhöfen auf alle getesteten Substanzen, reagierte *A. actinomycetemcomitans* (5,8 mm).

Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den grampositiven und gramnegativen Mikroorganismen. Da der Fokus auf den gramnegativen Keimen bei Gingivitis lag, wurden nur zwei Stämme mit grampositivem Zellwandaufbau in die Studie einbezogen. Tendenziell reagierten die grampositiven Erreger (Mittelwert 8,2 mm) sensitiver auf die getesteten Mundspüllösungen als die gramnegativen (Mittelwert 6,9 mm). Demnach könnte der Aufbau der Zellwand eine Rolle für den Wirkmechanismus der Lösungen spielen. Bei Stanley et al. [63] bestand, ähnlich wie in der vorliegenden Untersuchung, kein Unterschied in der Wachstumshemmung von grampositiven und gramnegativen Erregern im Agardiffusionstest. Eick et al. [64] und Haffajee et al. [132] konnten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Empfindlichkeit der Bakterien mit unterschiedlichem gram-Färbeverhalten feststellen. Allerdings zeigten sich in beiden Studien die gramnegativen Bakterien tendenziell empfindlicher gegenüber CHX und Listerine®. Dies kann zum einen an unterschiedlichen CHX- und Listerine®-Lösungen liegen, zum anderen auch am Einsatz anderer Bakterienstämme und Nährböden für die Versuche. Gerade bei CHX wäre durch die positive Ladung des Moleküls eine bessere Wirksamkeit auf die negativ geladene Zellwand von grampositiven Mikroorganismen zu erwarten [41]. Dies konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden.

Die Beurteilung der wachstumshemmenden Wirkung in Abhängigkeit vom Stoffwechselverhalten der Mikroorganismen stellt sich ähnlich schwierig dar, wie die Beurteilung der Auswirkung des gram-Färbeverhalten. Die Anaerobier (Mittelwert 7,8 mm) reagierten etwas sensibler auf die Mundspüllösungen als die fakultativ anaeroben Keime (Mittelwert 7,3 mm). Auch hier muss beachtet werden, dass der Fokus auf den anaeroben Keimen lag und ihre Zahl in der Gesamtheit des getesteten Bakterienkollektivs überwiegt. Grund für eine stärkere Wachstumshemmung könnte, neben einer erhöhten Sensitivität gegenüber den Lösungen, auch der kurze Kontakt der Anaerobier mit Sauerstoff, während des Einschweißens in Beutel mit Anaerocult®A gewesen sein. Allerdings wäre der Zellrasen auf den Agarplatten nicht nur im Bereich der Hemmhöfe um die Celluloseblättchen, sondern insgesamt, ungleichmäßig und dünner ausgefallen. Da die beiden fakultativen Anaerobier, *A. actinomycetemcomitans* und *S. mutans*, den größten Unterschied in der Empfindlichkeit aller getesteten Stämme zeigten, ist ein Versuch mit einer höheren Anzahl an fakultativen Anaerobiern sinnvoll, um einen aussagekräftigen Mittelwert bilden zu können. In der Literatur waren keine Vergleiche zwischen der Sensitivität von fakultativ anaeroben zu strikt anaeroben Mikroorganismen auf Mundspüllösungen zu finden.

#### *Beurteilung der Wirkung auf gramnegative anaerobe Bakterien*

Da in den klinischen Studien zu Gingivitis bei KFO-Patienten am häufigsten gramnegative anaerobe Bakterien auftraten, steht die Wirksamkeit der Mundspüllösungen vor allem auf diese Keime im Fokus. Grüner Tee zeigte keine Wirkung auf die in dieser Studie untersuchten gramnegativen anaeroben Bakterien *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *P. intermedia*. Sensodyne® ProSchmelz® bewirkte gemeinsam mit CHX die stärkste Wachstumshemmung auf *F. nucleatum* und führte insgesamt zu signifikant größeren Hemmhofdurchmessern als ACT® Anticavity Kids OceanBerry® und Listerine® Zero™ ( $p < 0,05$ ). Auch der Hemmhof von *P. gingivalis* war bei Sensodyne® ProSchmelz® tendenziell, aber nicht signifikant, größer als bei ACT® Anticavity Kids OceanBerry® und Listerine® Zero™. *P. intermedia* reagierte dagegen tendenziell sensibler auf Listerine® Zero™.

Abschließend kann eine Empfehlung aller getesteten Mundspüllösungen, außer der Teelösungen, zur unterstützenden Mundhygiene bei Gingivitis während der Behandlung mit MBA ausgesprochen werden. Als kurzfristiges Therapeutikum ist

Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei am besten geeignet. Zur dauerhaften chemischen Plaquekontrolle sind sowohl ACT® Anticavity Kids OceanBerry® als auch Listerine® Zero™ und Sensodyne® ProSchmelz® zu empfehlen. Sensodyne® ProSchmelz® führte zu signifikant stärkeren Wachstumshemmungen bei den getesteten Stämmen ( $p < 0,0001$ ) und scheint daher zur langfristigen Anwendung am besten geeignet. Da die Hemmhofdurchmesser insgesamt gering ausfielen, wäre eine klinische Studie mit diesen Mundspüllösungen bei KFO-Patienten sinnvoll, um die Wirksamkeit *in vivo* zu überprüfen. Aufgrund der wachstumshemmenden Wirkung des grünen Tees auf *S. mutans*, wären auch hier weitere Untersuchungen wünschenswert, um pflanzliche Arzneimittel zu nutzen und in die Therapie miteinzubeziehen.

## 6. Zusammenfassung

Bei KFO-Patienten tritt während der Therapie mit festsitzenden Apparaturen häufig eine plaque-induzierte Gingivitis auf. Zur Behandlung der Gingivitis werden, neben mechanischen Mundhygienemaßnahmen, unterschiedliche Mundspüllösungen eingesetzt. Lösungen aus Arzneimittelpflanzen können eine zusatzstofffreie Alternative zu herkömmlichen Produkten darstellen.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war der Vergleich der antibakteriellen Wirksamkeit von verschiedenen Mundspüllösungen mit pflanzlichen Teelösungen *in vitro*. Pathogene Mikroorganismen, die bei KFO-Patienten mit Gingivitis häufig isoliert wurden, standen im Fokus.

Grüner Tee und *L. japonica* wurden im Vergleich zu ACT® Anticavity Kids OceanBerry®, Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei, Listerine® Zero™ und Sensodyne® ProSchmelz® im Agardiffusionstest auf ihre antibakterielle Wirksamkeit gegenüber *A. actinomycetemcomitans*, *A. israelii*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* und *S. mutans* überprüft.

Alle handelsüblichen Mundspüllösungen führten bei den getesteten Bakterien zu einer Wachstumshemmung. Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei bewirkte die größten Hemmhofdurchmesser (Mittelwert: 19,4 mm), gefolgt von Sensodyne® ProSchmelz® (Mittelwert: 10,2 mm), Listerine® Zero™ (Mittelwert: 8,1 mm) und ACT® Anticavity Kids OceanBerry® (Mittelwert: 7,2 mm). Der grüne Tee zeigte nur auf *S. mutans* eine antibakterielle Wirkung, die vergleichbar mit Sensodyne® ProSchmelz® und ACT® Anticavity Kids OceanBerry® auf *S. mutans* war. *L. japonica* führte bei keinem der getesteten Mikroorganismen zu einer Wachstumshemmung.

Die Ergebnisse zeigen, dass vor allem Chlorhexamed® FORTE 0,2% alkoholfrei zur Therapie von Gingivitis geeignet ist, da es die stärkste wachstumshemmende Wirkung auf die Keime besaß, was im Einklang mit Ergebnissen vergleichbarer Studien steht. Die Fluoridlösungen mit und ohne ätherische Öle sind aufgrund der schwächeren antibakteriellen Wirkung, aber auch weniger unerwünschter Nebenwirkungen, zur Prävention einzusetzen. Die Teelösungen sollten in Bezug auf ihre Inhaltsstoffe analysiert werden. Der Grüne Tee könnte nach weiteren klinischen Untersuchungen zu seiner Wirksamkeit eine Alternative zu herkömmlichen Mundspüllösungen darstellen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Gwinnett, A.J. and R.F. Ceen, *Plaque distribution on bonded brackets: A scanning microscope study*. American Journal of Orthodontics, 1979. 75(6): p. 667-677.
2. Zachrisson, B.U., *Cause and prevention of injuries to teeth and supporting structures during orthodontic treatment*. American Journal of Orthodontics, 1976. 69(3): p. 285-300.
3. Balenseifen, J.W. and J.V. Madonia, *Study of dental plaque in orthodontic patients*. J Dent Res, 1970. 49(2): p. 320-4.
4. Purucker, P., et al., *[Effect of various orthodontic retention elements on the composition of subgingival microflora]*. Dtsch Zahnärztl Z, 1987. 42(5): p. 458-62.
5. Atack, N.E., J.R. Sandy, and M. Addy, *Periodontal and microbiological changes associated with the placement of orthodontic appliances. A review*. J Periodontol, 1996. 67(2): p. 78-85.
6. Zachrisson, B.U. and S. Zachrisson, *Caries incidence and oral hygiene during orthodontic treatment*. Scand J Dent Res, 1971. 79(6): p. 394-401.
7. Brightman, L.J., et al., *The effects of a 0.12% chlorhexidine gluconate mouthrinse on orthodontic patients aged 11 through 17 with established gingivitis*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1991. 100(4): p. 324-9.
8. Stamm, J.W., *Epidemiology of gingivitis*. J Clin Periodontol, 1986. 13(5): p. 360-66.
9. Jenkins, W.M. and P.N. Papapanou, *Epidemiology of periodontal disease in children and adolescents*. Periodontol 2000, 2001. 26: p. 16-32.
10. Jordan, A.R., W. Micheelis, and C. Cholmakow-Bodechtel, *Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V)*. Materialienreihe / Institut der Deutschen Zahnärzte. Vol. Band 35. 2016, Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV GmbH.
11. Massler, M., I. Schour, and B. Chopra, *Occurrence of gingivitis in suburban Chicago school children*. J Periodontol, 1950. 21(3): p. 146-64; passim.
12. Micheelis, W. and U. Schiffner, *Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV)*. 2006: Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV Köln.
13. KZBV, *Jahrbuch 2017 - Statistische Basisdaten zur vertragszahnärztlichen Versorgung*. 2017, Köln.
14. Kahl-Nieke, B., *Einführung in die Kieferorthopädie : Diagnostik, Behandlungsplanung, Therapie*. 3., überarb. Aufl. ed. 2010, Köln.
15. Diamanti-Kipiotti, A., F.A. Gusberti, and N.P. Lang, *Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances*. J Clin Periodontol, 1987. 14(6): p. 326-33.
16. Torlakovic, L., et al., *Changes in the supragingival microbiota surrounding brackets of upper central incisors during orthodontic treatment*. Acta Odontol Scand, 2013. 71(6): p. 1547-54.

17. Zanatta, F.B., et al., *Association between gingival bleeding and gingival enlargement and oral health-related quality of life (OHRQoL) of subjects under fixed orthodontic treatment: a cross-sectional study*. BMC Oral Health, 2012. 12: p. 53.
18. Schiffner, U., *Wissenschaftliche Stellungnahme der DGZMK - Mechanische und chemische Plaquereduktion*. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift, 1995. 50.
19. Acharya, S., et al., *Effect of three different motivational techniques on oral hygiene and gingival health of patients undergoing multibracketed orthodontics*. Angle Orthod, 2011. 81(5): p. 884-8.
20. Haas, A.N., et al., *Mouthwashes for the control of supragingival biofilm and gingivitis in orthodontic patients: evidence-based recommendations for clinicians*. Brazilian Oral Research, 2014. 28: p. 1-8.
21. Thomas, A., S. Thakur, and S. Mhambrey, *Comparison of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine, sodium fluoride, fluoride with essential oils, alum, green tea, and garlic with lime mouth rinses on cariogenic microbes*. J Int Soc Prev Community Dent, 2015. 5(4): p. 302-8.
22. Behfarnia, P., et al., *The Efficacy of Green Tea Chewing Gum on Gingival Inflammation*. Journal of Dentistry, 2016. 17(2): p. 149-154.
23. Dr. Biswas, S., et al., *Comparative evaluation of the effect of Green tea, Listerine and Chlorhexidine mouth washes in gingivitis patients: A randomized controlled trial*. Scholars Journal of Dental Sciences (SJDS) 2015. 2(1): p. 104-112.
24. Gängler, P., et al., *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie*. 3., unveränderte Auflage ed. 2010: Thieme.
25. Hellwig, E., J. Klimek, and T. Attin, *Einführung in die Zahnerhaltung*. 6. überarbeitete Auflage ed. 2013: Deutscher Zahnärzte Verlag.
26. Marsh, P. and M.V. Martin, *Orale Mikrobiologie*. 2003: Thieme.
27. Eick, S., M. Pietkiewicz, and A. Sculean, *Oral microbiota in Swiss adolescents*. Clin Oral Investig, 2013. 17(1): p. 79-86.
28. Kim, S.H., et al., *Microbiologic changes in subgingival plaque before and during the early period of orthodontic treatment*. Angle Orthod, 2012. 82(2): p. 254-60.
29. Loesche, W.J. and S.A. Syed, *Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque and gingivitis score*. Infect Immun, 1978. 21(3): p. 830-9.
30. Kim, K., et al., *Clinical and microbiological findings at sites treated with orthodontic fixed appliances in adolescents*. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 2010. 137(2): p. 223-228.
31. Liu, H., et al., *Periodontal health and relative quantity of subgingival Porphyromonas gingivalis during orthodontic treatment*. Angle Orthod, 2011. 81(4): p. 609-15.
32. Sallum, E.J., et al., *Clinical and microbiologic changes after removal of orthodontic appliances*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2004. 126(3): p. 363-6.

33. Cardoso-Silva, C., et al., *Microbiological analysis of gingivitis in pediatric patients under orthodontic treatment*. Eur J Paediatr Dent, 2011. 12(4): p. 210-4.
34. Liu, P., et al., *Detection of fusobacterium nucleatum and fadA adhesin gene in patients with orthodontic gingivitis and non-orthodontic periodontal inflammation*. PLoS One, 2014. 9(1): p. e85280.
35. Naranjo, A.A., et al., *Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2006. 130(3): p. 275.e17-22.
36. Ristic, M., et al., *Effects of fixed orthodontic appliances on subgingival microflora*. Int J Dent Hyg, 2008. 6(2): p. 129-36.
37. Paolantonio, M., et al., *Site-specific subgingival colonization by Actinobacillus actinomycetemcomitans in orthodontic patients*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1999. 115(4): p. 423-8.
38. Muller, H.P. and L. Flores de Jacoby, *[Composition of the oral subgingival flora in wearers of fixed orthodontic appliances]*. Dtsch Zahnarztl Z, 1982. 37(10): p. 855-60.
39. Tanner, A.C., et al., *White-spot lesions and gingivitis microbiotas in orthodontic patients*. J Dent Res, 2012. 91(9): p. 853-8.
40. Rosen, G. and M.N. Sela, *Coaggregation of Porphyromonas gingivalis and Fusobacterium nucleatum PK 1594 is mediated by capsular polysaccharide and lipopolysaccharide*. FEMS Microbiol Lett, 2006. 256(2): p. 304-10.
41. Sanderik, R.B.A., et al., *Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunologie*. 2004: Quintessenz Verlag.
42. Kamaguchi, A., et al., *Coaggregation of Porphyromonas gingivalis and Prevotella intermedia*. Microbiology and Immunology, 2001. 45(9): p. 649-656.
43. Singh, A., et al., *The Capsule of Porphyromonas gingivalis Leads to a Reduction in the Host Inflammatory Response, Evasion of Phagocytosis, and Increase in Virulence*. Infection and Immunity, 2011. 79(11): p. 4533-4542.
44. How, K.Y., K.P. Song, and K.G. Chan, *Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line*. Front Microbiol, 2016. 7: p. 53.
45. Hajishengallis, G., R.P. Darveau, and M.A. Curtis, *The keystone-pathogen hypothesis*. Nat Rev Microbiol, 2012. 10(10): p. 717-25.
46. Boyar, R.M., et al., *The microflora associated with the development of initial enamel decalcification below orthodontic bands in vivo in children living in a fluoridated-water area*. J Dent Res, 1989. 68(12): p. 1734-8.
47. Macpherson, L.M., T.W. MacFarlane, and K.W. Stephen, *An intra-oral appliance study of the plaque microflora associated with early enamel demineralization*. J Dent Res, 1990. 69(11): p. 1712-6.
48. Kossack, C. and P.G. Jost-Brinkmann, *Plaque and gingivitis reduction in patients undergoing orthodontic treatment with fixed appliances-comparison of toothbrushes and interdental cleaning aids. A 6-month clinical single-blind trial*. J Orofac Orthop, 2005. 66(1): p. 20-38.

49. Dörfer, C.E., U. Schiffner, and H.J. Staehle, *Wissenschaftliche Stellungnahme der DGZMK - Häusliche mechanische Zahn- und Mundpflege*. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift, 2007. 62.
50. Zanatta, F.B., C.H. Moreira, and C.K. Rosing, *Association between dental floss use and gingival conditions in orthodontic patients*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2011. 140(6): p. 812-21.
51. Boyd, R.L., *Longitudinal evaluation of a system for self-monitoring plaque control effectiveness in orthodontic patients*. J Clin Periodontol, 1983. 10(4): p. 380-8.
52. Maruniak, J., et al., *The effect of 3 mouthrinses on plaque and gingivitis development*. J Clin Periodontol, 1992. 19(1): p. 19-23.
53. Chambers, C., et al., *Prevention and treatment of demineralisation during fixed appliance therapy: a review of current methods and future applications*. Br Dent J, 2013. 215(10): p. 505-11.
54. Jones, C.G., *Chlorhexidine: is it still the gold standard?* Periodontology 2000, 1997. 15(1): p. 55-62.
55. Denton, G., *Chlorhexidine*, in *Disinfection, Sterilization and Preservation*, P.D. Seymour S. Block, Editor. 2001, Lippincott Williams & Wilkins. p. 321-336.
56. Haydari, M., et al., *Comparing the effect of 0.06% -, 0.12% and 0.2% Chlorhexidine on plaque, bleeding and side effects in an experimental gingivitis model: a parallel group, double masked randomized clinical trial*. BMC Oral Health, 2017. 17(1): p. 118.
57. Rølla, G., H. Løe, and C.R. Schiøtt, *Retention of chlorhexidine in the human oral cavity*. Archives of Oral Biology, 1971. 16(9): p. 1109-IN33.
58. Loe, H. and C.R. Schiott, *The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man*. J Periodontal Res, 1970. 5(2): p. 79-83.
59. Fine, D.H., *Mouthrinses as adjuncts for plaque and gingivitis management. A status report for the American Journal of Dentistry*. Am J Dent, 1988. 1(6): p. 259-63.
60. Anderson, G.B., et al., *Clinical effects of chlorhexidine mouthwashes on patients undergoing orthodontic treatment*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1997. 111(6): p. 606-12.
61. Gehlen, I., et al., *The influence of a 0.2% chlorhexidine mouthrinse on plaque regrowth in orthodontic patients. A randomized prospective study. Part II: Bacteriological parameters*. J Orofac Orthop, 2000. 61(2): p. 138-48.
62. Addy, M., et al., *The comparative tea staining potential of phenolic, chlorhexidine and anti-adhesive mouthrinses*. J Clin Periodontol, 1995. 22(12): p. 923-8.
63. Stanley, A., M. Wilson, and H. Newman, *The in vitro effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria*. Journal of clinical periodontology, 1989. 16(4): p. 259-264.

64. Eick, S., et al., *Efficacy of chlorhexidine digluconate-containing formulations and other mouthrinses against periodontopathogenic microorganisms*. Quintessence Int, 2011. 42(8): p. 687-700.
65. Hellwig, E., U. Schiffner, and A. Schulte, *S2-k-Leitlinie: Fluoridierungsmaßnahmen zur Kariesprophylaxe - DGZMK*. 2013.
66. O'Reilly, M.M. and J.D. Featherstone, *Demineralization and remineralization around orthodontic appliances: an in vivo study*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1987. 92(1): p. 33-40.
67. Mengel, R., et al., *Comparative study of plaque and gingivitis prevention by AmF/SnF<sub>2</sub> and NaF. A clinical and microbiological 9-month study*. J Clin Periodontol, 1996. 23(4): p. 372-8.
68. Ogaard, B., et al., *A prospective, randomized clinical study on the effects of an amine fluoride/stannous fluoride toothpaste/mouthrinse on plaque, gingivitis and initial caries lesion development in orthodontic patients*. Eur J Orthod, 2006. 28(1): p. 8-12.
69. Yates, R., et al., *The effects of a potassium citrate, cetylpyridinium chloride, sodium fluoride mouthrinse on dentine hypersensitivity, plaque and gingivitis. A placebo-controlled study*. J Clin Periodontol, 1998. 25(10): p. 813-20.
70. Qian, W., J. Zhang, and X. Xiao, *[Research on inhibition of sodium fluoride on five subgingival bacteria in vitro]*. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 1998. 16(2): p. 105-7.
71. Tardugno, R., et al., *Phytochemical composition and in vitro screening of the antimicrobial activity of essential oils on oral pathogenic bacteria*. Nat Prod Res, 2017: p. 1-8.
72. Pan, P., et al., *Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method*. J Clin Periodontol, 2000. 27(4): p. 256-61.
73. Dagli, N., et al., *Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review*. Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry, 2015. 5(5): p. 335-340.
74. GmbH, J.J. *Produkte - Listerine Zero*. 29.08.2017; Available from: <http://www.listerine.de/produkte/entschaerft-im-geschmack-ohne-alkohol>.
75. Zamora-Perez, A.L., et al., *Increased number of micronuclei and nuclear anomalies in buccal mucosa cells from people exposed to alcohol-containing mouthwash*. Drug Chem Toxicol, 2013. 36(2): p. 255-60.
76. Pizzo, G., et al., *Effects of two essential oil mouthrinses on 4-day supragingival plaque regrowth: A randomized cross-over study*. Vol. 26. 2013. 156-60.
77. McCullough, M.J. and C.S. Farah, *The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes*. Aust Dent J, 2008. 53(4): p. 302-5.
78. Bolanowski, S.J., G.A. Gescheider, and S.V. Sutton, *Relationship between oral pain and ethanol concentration in mouthrinses*. J Periodontal Res, 1995. 30(3): p. 192-7.

79. Kubert, D., et al., *Antiseptic mouthrinse-induced microbial cell surface alterations*. Am J Dent, 1993. 6(6): p. 277-9.
80. Mankodi, S., N.M. Ross, and K. Mostler, *Clinical efficacy of listerine in inhibiting and reducing plaque and experimental gingivitis*. J Clin Periodontol, 1987. 14(5): p. 285-8.
81. Vlachojannis, C., et al., *A Preliminary Investigation on the Antimicrobial Activity of Listerine®, Its Components, and of Mixtures Thereof*. Phytotherapy Research, 2015. 29(10): p. 1590-1594.
82. Battino, M., et al., *In vitro antioxidant activities of mouthrinses and their components*. J Clin Periodontol, 2002. 29(5): p. 462-7.
83. Fine, D.H., D. Furgang, and M.L. Barnett, *Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Periodontol, 2001. 28(7): p. 697-700.
84. Warnke, P.H., et al., *The battle against multi-resistant strains: Renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections*. J Craniomaxillofac Surg, 2009. 37(7): p. 392-7.
85. Karbach, J., et al., *Antimicrobial effect of Australian antibacterial essential oils as alternative to common antiseptic solutions against clinically relevant oral pathogens*. Clin Lab, 2015. 61(1-2): p. 61-8.
86. Tufekci, E., et al., *Effectiveness of an essential oil mouthrinse in improving oral health in orthodontic patients*. Angle Orthod, 2008. 78(2): p. 294-8.
87. Alves, K.M., et al., *Effectiveness of procedures for the chemical-mechanical control of dental biofilm in orthodontic patients*. J Contemp Dent Pract, 2010. 11(2): p. 041-8.
88. Charles, C., et al., *Anti plaque and antigingivitis efficacy of an alcohol-free essential-oil containing mouthrinse: A 2-week clinical trial*. Vol. 25. 2012. 195-8.
89. Cortelli, S., et al., *Long-term management of plaque and gingivitis using an alcohol-free essential oil containing mouthrinse: A 6-month randomized clinical trial*. Vol. 26. 2013. 149-55.
90. Marchetti, E., et al., *Alcohol-free essential oils containing mouthrinse efficacy on three-day supragingival plaque regrowth: a randomized crossover clinical trial*. Trials, 2017. 18(1): p. 154.
91. Cabrera, C., R. Artacho, and R. Gimenez, *Beneficial effects of green tea--a review*. J Am Coll Nutr, 2006. 25(2): p. 79-99.
92. Tsai, T.-H., et al., *In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs*. Food Chemistry, 2008. 110(4): p. 859-864.
93. Anita, P., et al., *In vitro antibacterial activity of Camellia sinensis extract against cariogenic microorganisms*. Journal of Basic and Clinical Pharmacy, 2014. 6(1): p. 35-39.

94. Taylor, P.W., J.M.T. Hamilton-Miller, and P.D. Stapleton, *Antimicrobial properties of green tea catechins*. Food science and technology bulletin, 2005. 2: p. 71-81.
95. Karygianni, L., et al., *Natural Antimicrobials and Oral Microorganisms: A Systematic Review on Herbal Interventions for the Eradication of Multispecies Oral Biofilms*. Front Microbiol, 2015. 6: p. 1529.
96. McKay, D.L. and J.B. Blumberg, *The role of tea in human health: an update*. J Am Coll Nutr, 2002. 21(1): p. 1-13.
97. Sharma, A., et al., *Green tea extract: possible mechanism and antibacterial activity on skin pathogens*. Food Chem, 2012. 135(2): p. 672-5.
98. Sakanaka, S., et al., *Antibacterial Substances in Japanese Green Tea Extract against Streptococcus mutans, a Cariogenic Bacterium*. Agricultural and Biological Chemistry, 1989. 53(9): p. 2307-2311.
99. Tehrani, M.H., G. Asghari, and M. Hajiahmadi, *Comparing Streptococcus mutans and Lactobacillus colony count changes following green tea mouth rinse or sodium fluoride mouth rinse use in children (Randomized double-blind controlled clinical trial)*. Dent Res J (Isfahan), 2011. 8(Suppl 1): p. S58-63.
100. Hamilton-Miller, J.M., *Anti-cariogenic properties of tea (Camellia sinensis)*. J Med Microbiol, 2001. 50(4): p. 299-302.
101. Araghizadeh, A., J. Kohanteb, and M.M. Fani, *Inhibitory activity of green tea (Camellia sinensis) extract on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria*. Med Princ Pract, 2013. 22(4): p. 368-72.
102. Hirasawa, M., et al., *Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: a clinical pilot study*. J Periodontal Res, 2002. 37(6): p. 433-8.
103. Kubo, I., H. Muroi, and M. Himejima, *Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992. 40(2): p. 245-248.
104. Muroi, H. and I. Kubo, *Combination effects of antibacterial compounds in green tea flavor against Streptococcus mutans*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993. 41(7): p. 1102-1105.
105. Yoshinaga, Y., et al., *Green tea extract inhibits the onset of periodontal destruction in rat experimental periodontitis*. J Periodontal Res, 2014. 49(5): p. 652-9.
106. Okamoto, M., et al., *Inhibitory effect of green tea catechins on cysteine proteinases in Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol Immunol, 2004. 19(2): p. 118-20.
107. Okamoto, M., et al., *Inhibitory effects of green tea catechins on protein tyrosine phosphatase in Prevotella intermedia*. Oral Microbiol Immunol, 2003. 18(3): p. 192-5.
108. Sakanaka, S. and Y. Okada, *Inhibitory effects of green tea polyphenols on the production of a virulence factor of the periodontal-disease-causing anaerobic bacterium Porphyromonas gingivalis*. J Agric Food Chem, 2004. 52(6): p. 1688-92.

109. Feldheim, W. and S.-O. Mieke, *Fluoridgehalt in Teeblättern*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 1979. 169(6): p. 453-456.
110. Walters, C.B., et al., *Dietary intake of fluoride in the United Kingdom and fluoride content of some foodstuffs*. J Sci Food Agric, 1983. 34(5): p. 523-8.
111. Balappanavar, A.Y., V. Sardana, and M. Singh, *Comparison of the effectiveness of 0.5% tea, 2% neem and 0.2% chlorhexidine mouthwashes on oral health: a randomized control trial*. Indian J Dent Res, 2013. 24(1): p. 26-34.
112. Hambire, C.U., et al., *Comparing the antiplaque efficacy of 0.5% Camellia sinensis extract, 0.05% sodium fluoride, and 0.2% chlorhexidine gluconate mouthwash in children*. J Int Soc Prev Community Dent, 2015. 5(3): p. 218-26.
113. Shang, X., et al., *Lonicera japonica Thunb.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine*. Journal of Ethnopharmacology, 2011. 138(1): p. 1-21.
114. Chang, H. and P. Pui-Hay, *JinYinHua*, in *Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica*. 1987, World Scientific Publishing Co.: USA. p. 787-791.
115. Chen, W.C., et al., *Wound repair and anti-inflammatory potential of Lonicera japonica in excision wound-induced rats*. BMC Complement Altern Med, 2012. 12: p. 226.
116. Cheng, B.C.-Y., et al., *A herbal formula consisting of Rosae Multiflorae Fructus and Lonicerae Japonicae Flos inhibits inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages*. Journal of ethnopharmacology, 2014. 153(3): p. 922-927.
117. Jin, H., et al., *Comparison of anti-bacterial activity of three types of di-O-caffeoylquinic acids in Lonicera japonica flowers based on microcalorimetry*. Chinese journal of natural medicines, 2014. 12(2): p. 108-113.
118. Rahman, A. and S.C. Kang, *In vitro control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of Lonicera japonica Thunb*. Food Chemistry, 2009. 116(3): p. 670-675.
119. Peng, L.-Y., et al., *Constituents from Lonicera japonica*. Fitoterapia, 2000. 71(6): p. 713-715.
120. Xiong, J., et al., *Screening and identification of the antibacterial bioactive compounds from Lonicera japonica Thunb. leaves*. Food chemistry, 2013. 138(1): p. 327-333.
121. Kang, O.H., et al., *Luteolin isolated from the flowers of Lonicera japonica suppresses inflammatory mediator release by blocking NF-kappaB and MAPKs activation pathways in HMC-1 cells*. Molecules, 2010. 15(1): p. 385-98.
122. Yoo, H.J., et al., *Anti-angiogenic, antinociceptive and anti-inflammatory activities of Lonicera japonica extract*. J Pharm Pharmacol, 2008. 60(6): p. 779-86.

123. Cai, L., *Compounds from Syzygium aromaticum Possessing Growth Inhibitory Activity Against Oral Pathogens*. Journal of Natural Products, 1996. 59(10): p. 987-990.
124. Wong, R.W., et al., *Antimicrobial activity of Chinese medicine herbs against common bacteria in oral biofilm. A pilot study*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2010. 39(6): p. 599-605.
125. Leibniz-Institut DSMZ, D.S.f.M.u.Z.G., *Medium 92 - Trypticase Soy Yeats Extract Medium*. 2012.
126. Leibniz-Institut DSMZ, D.S.f.M.u.Z.G., *Medium 104 - PYG Medium (modified)*. 2009.
127. Leibniz-Institut DSMZ, D.S.f.M.u.Z.G., *Medium 110- Chopped Meat Medium With Carbohydrates*. 2016.
128. Abouassi, T., et al., *Does human saliva decrease the antimicrobial activity of chlorhexidine against oral bacteria?* BMC Res Notes, 2014. 7: p. 711.
129. Fry, D.E., *The Hawthorne Effect Revisited*. Dis Colon Rectum, 2018. 61(1): p. 6-7.
130. Feil, P.H., et al., *Intentional use of the Hawthorne effect to improve oral hygiene compliance in orthodontic patients*. J Dent Educ, 2002. 66(10): p. 1129-35.
131. Botelho, M.G., *The minimum inhibitory concentration of oral antibacterial agents against cariogenic organisms*. Microbios, 2000. 103(404): p. 31-41.
132. Haffajee, A.D., T. Yaskell, and S.S. Socransky, *Antimicrobial effectiveness of an herbal mouthrinse compared with an essential oil and a chlorhexidine mouthrinse*. J Am Dent Assoc, 2008. 139(5): p. 606-11.
133. Singh, A., A. Daing, and J. Dixit, *The effect of herbal, essential oil and chlorhexidine mouthrinse on de novo plaque formation*. Int J Dent Hyg, 2013. 11(1): p. 48-52.
134. Akinyele, B.J., et al., *Comparative Study of the Antibacterial Effect of Mouth Washes and Vernonia amygdalina (del.) on Some Tooth Decay Causing Bacteria*. British Microbiology Research Journal, 2014. 4(7): p. 749-758.
135. Demirel, G., et al., *In vitro Antimicrobial Activity of Various Mouthrinses against Streptococcus mutans, Lactobacillus casei, L. acidophilus and Candida albicans*. British Journal of Medicine & Medical Research, 2015. 9(11): p. 1-5.
136. Fine, D.H., et al., *In vivo antimicrobial effectiveness of an essential oil-containing mouth rinse 12 h after a single use and 14 days' use*. J Clin Periodontol, 2005. 32(4): p. 335-40.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater aus der Poliklinik für Kieferorthopädie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg -Universität Mainz für die Überlassung und Betreuung des von ihm gestellten Themas.

Außerdem danke ich für die bereitwillige Erstellung des Zweitgutachtens.

Ganz herzlich danke ich meiner Betreuerin, die mich stets für das gestellte Thema motivierte und während des Erlernens des wissenschaftlichen Arbeitens unterstützte. Mit ihren wertvollen Ratschlägen und konstruktiver Kritik stand sie mir jederzeit zur Seite.

Mein Dank gilt dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg - Universität Mainz für die Unterstützung und Beratung während der experimentellen Phase und die Einarbeitung in die mikrobiologischen Arbeitstechniken.

Des Weiteren möchte ich mich für die unverzichtbare Hilfe bei der statistischen Auswertung des Materials bei den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg - Universität Mainz bedanken.

Dem Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen Braunschweig gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Entwicklung der Laborabläufe und der Durchführung der Versuche.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie für die liebevolle Unterstützung und Motivation während des Studiums und der Promotion ganz herzlich danken.