

## Антибактериальное действие Cupral® на оральные биопленки - исследование *in vitro*

**Цель:** это исследование было направлено на оценку эффективности Cupral®, Ca (OH) 2 и материалы на основе Cu<sup>2+</sup>, используемые в эндодонтии, против биопленок оральных видов *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* на разных стадиях созревания.

### Методы.

Биопленки бактериальных видов-мишеней выращивали в среде бульона (ВН) в течение 1 - 5 дней на титановых дисках (титан, класс 4) для сбора микробных сообществ на разных стадиях созревания биопленки. Биопленки подвергались воздействию различных концентраций Cupral® (разбавление в 4, 15 и 50 раз.) для оценки антимикробного эффекта и эффекта растворения биопленки. Раствор 0,2% хлоргексидин глюконата (СНХ) было использовано в качестве положительного контроля. Биологическое и антибактериальное действие были проанализированы окрашиванием «живой / мертвый» в сочетании с конфокальной лазерной сканирующей микроскопией (CLSM) для количественной оценки отслоения биопленки и антибактериальной эффективности.

### Результаты

Все протестированные концентрации Cupral® показали сильный антибактериальный эффект на тестируемые виды бактерий на всех этапах созревания биопленки. Эффективность отрыва биопленки зависела от концентрации, т.е. увеличение концентрации Cupral® обычно приводило к увеличению отслоения биопленки.

Антибактериальная эффективность тестируемого Cupral® была, по крайней мере, равна обработке СНХ ( $P = 0,03$ ).

**Вывод:** Cupral® обладает сильной антибиопленочной эффективностью и может применяться для перорального лечения биопленок и контроля в стоматологических дисциплинах, кроме эндодонтии. Ключевые слова: антибактериальный, антибиопленка, биопленка, лизис биопленки, отрыв биопленки, Cupral®, оральная инфекция, лечение.

## ВВЕДЕНИЕ

Болезни полости рта являются наиболее распространенными хроническими инфекциями в мире (1); в большинстве случаев причины этого разрушение зубов и периодонтит (2, 3).

Большинство заболеваний полости рта вызываются бактериальной биопленкой.

Образование биопленки является естественным процессом в полости рта и, как известно, более 700 различных бактерий взаимодействуют в микробных сообществах в полости рта (4).

В прикрепленных микробных сообществах клетки заключены в матрицу самосекретируемых полимерных веществ, таких как ДНК, белки или полисахариды, которые образуют диффузионный барьер против антимикробных веществ и иммунного ответа хозяина (5) и адаптируют метаболическую активность к жизненному циклу биопленки. Как следствие, устойчивость к антибиотикам может увеличиться в несколько сотен раз, что делает медикаментозное лечение зачастую неэффективным (6, 7).

В настоящее время все большее внимание уделяется использованию меди в качестве антибактериального соединения (8-13); например, медь и медные сплавы были зарегистрированы в качестве первого твердого антимикробного материала Агентством по охране окружающей среды США в 2010 году (8).

Были предложены несколько механизмов антибактериального действия ионов меди:

а) образование гидроксильных радикалов (14),

- б) окислительное сшивание остатков тиолов в белках (8) и
- в) конкуренция между ионами меди и других металлов за связывания белков сайты (15, 16).

Использование гидроксида кальция в качестве дезинфицирующего средства в стоматологии было введено в 1920 году В.В. Hermann (17). С тех пор он стал одним из основных антисептических препаратов в эндодонтии. В водных растворах  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  диссоциирует на ионы кальция и гидроксильные ионы:  $\text{Ca}(\text{OH})_2 \rightarrow \text{Ca}^{2+} + 2\text{OH}^-$ .

Выделение гидроксидных ионов в водных растворах порождает сильную щелочную (микро) среду; насыщенный раствор  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  имеет pH 12,4 (18). Сильная щелочная среда вызывает разделение цепи ДНК также, как белки претерпевают конформационные изменения из-за депротонирования кислотных остатков (19). В обоих случаях биомолекулы денатурируют и теряют свои биологические функции. Ограниченная растворимость  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  в воде - 1,7 г / л (20) вызывает медленное и постепенное высвобождение ионов насыщенных составов (21), и, таким образом, суспензии подходят для применения в качестве промежуточной обработки (22-24). Также сообщается, что его активность против биопленок ограничена (25, 26).

Бактерицидная эффективность лекарственного средства Cupral® основана на комбинированной бактерицидной активности ионов/комплексов меди и ее сильном потенциале подщелачивания, благодаря высвобождению гидроксид-ионов из  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  и  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ . Хотя Cupral® используется в эндодонтии более десяти лет и оказался эффективным, только несколько исследований проанализировали его биоцидный потенциал более подробно (27), а исследования, направленные на эффективность против пероральных биопленок пока отсутствуют. Следовательно, целью данного исследования было оценить эффективность Cupral® против оральных биопленок комменсальных видов *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus oralis* и *Streptococcus gordonii* на разных стадиях созревания и концентраций субстанции.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Этическое одобрение для текущего исследования было дано местным комитетом по этике (№ 4348, Ганноверская медицинская школа, Германия).

### **Штаммы бактерий и условия культивирования**

Штаммы бактерий *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A. ac.) DSM 1123, *Streptococcus oralis* (S. oralis) DSM 20627 и *Streptococcus gordonii* (S. gordonii) 20568 были получены из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ). Бактерии обычно размножали в среде ВНИ при 37 ° C как в аэробных (стрептококковых), так и в анаэробных условиях (A. ac.). Прекультуры выращивали в течение ночи (стрептококки) или в течение 72 ч (A. ac.) при перемешивании.

### **Формирование биопленки и условия динамического роста**

Биопленки были выращены на образцах титана (класс 4), поскольку они были использованы в предварительных исследованиях как хорошие основания для биопленки (28, 29). Образцы были в форме диска, толщиной 1,8 мм и 12 мм в диаметре. Образцы были наклеены на стеклянные покровные стекла с использованием Silagum Light (DMG, Гамбург, Германия), который впоследствии помещали в стеклянную стойку для окрашивания (рис. 1).

Прекультуры разводили до оптической плотности (OD 600) 0,03 и использовали для инокуляции 1,5 л питательной среды (ВНИ; Oxoid, Hampshire, UK). Стойки с фиксированными образцами титана были погружены в бактериальную суспензию и культивировались при 37°C при постоянном перемешивании со скоростью 200 об / мин с использованием магнитной мешалки системы Cimarec™ i Compact; Thermo Fisher, Уолтем, США.

По возможности культурную среду меняли каждые 48 часов. Эксперименты проводились в трех экземплярах в качестве независимых биологических повторений.

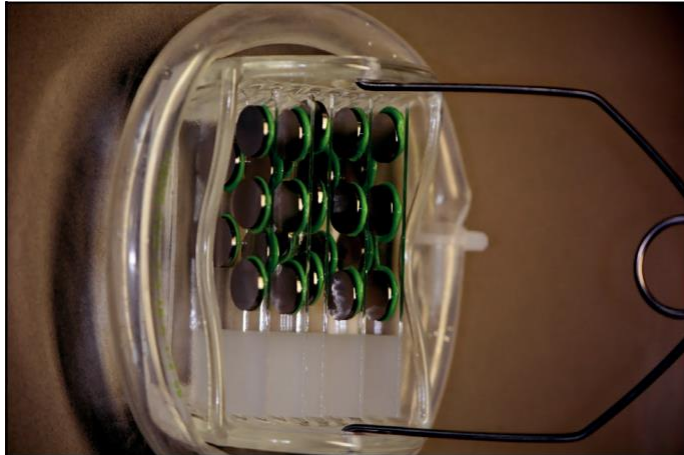


Рисунок 1. Техническая установка для формирования биопленки на образцах титана. Титановые диски приклеивают к микроскопическим предметным стеклам и помещают в стеклянную стойку для окрашивания перед погружением в питательный бульон и выращиванием на 1-5 дней

### **Обработка биопленок Cupral®**

Cupral® разбавляли 1: 4 (по объему; далее обозначается как C4), 1:15 (по объему обозначается как C15 далее) и 1:50 (по объему; далее обозначается как C50) с ddH<sub>2</sub>O для получения тестовых суспензий. Титановые диски с прикрепленными биопленками переносили в чашки Петри и погружали в три разных разведения Cupral® на 24 часа при 37 ° C. В качестве контроля биопленки инкубировали в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (отрицательный контроль, Biochrom GmbH, Берлин, Германия) и 0,2% растворе СНХ (положительный контроль; Меридол мед 0,2% СНХ, СР ГАМК, Гамбург, Германия). После стадии инкубации биопленки дважды промывали путем осторожного погружения в ddH<sub>2</sub>O, чтобы смыть любые прикрепленные твердые компоненты Cupral®. Супернатанты Cupral® из чашек Петри подвергали оценке роста бактерий путем посева 100 мкл суспензии на чашки с агаром ВНИ с последующей стадией инкубации при 37 ° C в течение по меньшей мере 24 часов.

### **Оценка жизнеспособности микробов в биопленках и супернатантах**

«Живые / мертвые» бактерии окрашивали (BacLight® Bacterial Viability Kit; Life Technologies, Карлсбад, США) флуоресцентными красителями Syto9 и йодидом пропидия (PI). Оба красителя смешивали в равных объемах и разбавляли 1: 1000 в PBS. Биопленки инкубировали в окрашивающем растворе в течение 30 минут в темноте, промывали в PBS и затем фиксировали в 2,5% (об. / об.) глутардальдегиде. Итак, Syto9 проходит через мембраны бактерий путем диффузии и внедряется в геномную ДНК. PI не может проникнуть через неповрежденные бактериальные мембраны. Если целостность клеточной мембраны нарушена, PI внедряется в геномную ДНК и вытесняет SYTO9. С помощью флуоресцентного микроскопического исследования можно различить оба состояния жизнеспособности клеток: жизненно важные клетки (неповрежденные мембраны) кажутся зелеными флуоресцентными, неживые клетки (поврежденные мембраны) красными флуоресцентными. Биопленки анализировали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (CLSM; Leica SP2, Wetzlar, Germany). Изображения z-стека (10-кратное увеличение, размер шага 3 мкм) были получены в трех рандомизированных положениях (центр, вверх, вниз) на воображаемой линии, проходящей через центр образца титана.

### **Количественная оценка антибактериального эффекта обработки Cupral®.**

Трехмерные реконструкции биопленок были обработаны из изображений z-стека с использованием программного пакета IMARES (версия 5.0; Bitplane AG, Zürich Schweiz) и рассчитаны пространственные параметры микробных агломератов. Минимальное значение интенсивности, равное 12,52, было предварительно установлено для компенсации фоновой флуоресценции при неспецифическом прикреплении частиц Syto9 к Ca (OH)<sub>2</sub>. Исходя из объема красных флуоресцентных (не жизненно важных) и зеленых флуоресцентных (жизненно важных) клеток, для каждого изображения z-стека было создано соотношение живой / мертвой. Средняя высота биопленки рассчитывалась по биобъемам и размеру среза изображения и выражалась в процентном соотношении относительно необработанного контрольного образца биопленки. Следующие результаты были расценены как антибактериальные: а) отделение биопленки от поверхности вследствие химически индуцированной деградации и

б) увеличение процента поврежденных мембранами (мертвых) клеток в обработанных биопленках по сравнению с необработанными контрольными образцами.

#### **Статистический анализ**

Весь статистический анализ выполнялся с использованием пакета статистического программного обеспечения SPSS, версия 24.0 (IBM Cooperation, Armonk, США). Корреляции между высотой биопленки и процедурой обработки, а также жизнеспособностью клеток и процедурой обработки были проанализированы с использованием омнибус-теста Крускала-Уоллиса. Результаты эксперимента были оценены с использованием следующих нулевых гипотез: «Распределение относительной высоты биопленки одинаково по всем категориям лечения» и «Распределение процентных авитальных клеток одинаково по всем категориям лечения» со последующим сравнением по группам. Значения значимости были скорректированы с помощью поправки Бонферрони для нескольких тестов; значение  $P < 0,05$  считалось статистически значимым.

### **ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ**

#### ***Streptococcus gordonii***

Образование биопленки на поверхностях образца титана воспроизводилось на всех независимых биологических повторностях. Суспензии С4 и С15 наиболее эффективно отделяют микробиологические агломераты от поверхностей. С50 показал самый низкий потенциал отрыва биопленки. Отслоение биопленки, как правило, уменьшалось на 3-дневные биопленки (рис. 2а, верхний прямоугольник).

Различия в высоте биопленки были статистически значимыми между различными категориями лечения: С4-СНХ ( $P < 0,001$ ), С15-СНХ ( $P < 0,001$ ) и С50-СНХ ( $P = 0,03$ ). Статистической значимости не наблюдалось при сравнении относительных высот биопленки попарно для разных стадий созревания биопленки и режимов обработки. Супернатанты препаратов, обработанных Cupral®, были проанализированы на жизнеспособные планктонные клетки. Для обработок С15 и С50 жизнеспособных клеток не обнаружено при культивировании на твердом питательном агаре. Для препаратов С4 образование колоний не было обнаружено, однако высокое содержание твердых частиц Са (ОН) 2 ухудшало обнаружение колоний бактерий. Биопленки, обработанные СНХ показали увеличенный биообъем по сравнению с образцами, обработанными Cupral®. Количество биопленки на поверхности было по меньшей мере в два раза выше для стадий созревания 1-й, 2-й, 3-й и 5-й день по сравнению с необработанными контролями. Только для 4-дневных биопленок обработка СНХ привела к 20% -ному уменьшению биологических объемов.

Оставшиеся клеточные агломераты на поверхностях наблюдались только при обработке С50 (рис. 2, нижний прямоугольник); Лечение СНХ не привело к заметному отслоению биопленки. Обработка СНХ приводила к более низкой скорости повреждения клеток по сравнению с обработкой С50. Однако это различие не было статистически значимым. Растворы С4 и С15 не учитывались при статистическом анализе в связи с отсутствием данных из-за отделения биопленок от поверхностей.

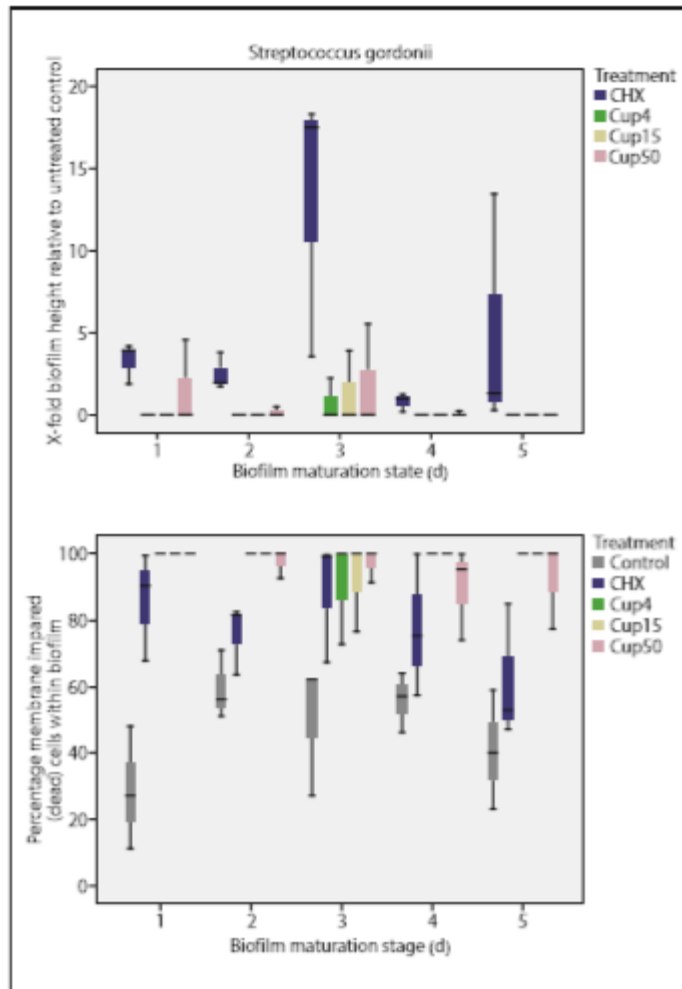


Рисунок 2. Диаграммы изображают влияние обработки Cupral® на высоту биопленки и выживаемость клеток биопленок *S. gordonii* на разных стадиях созревания; верхний прямоугольник: изменение средней высоты биопленки по сравнению с необработанным контролем в ответ на обработку Cupral® в течение 24 часов; нижний прямоугольник: относительная доля мертвых клеток в биопленках после 24 ч инкубации в суспензии Cupral®

### **Streptococcus oralis.**

Образование биопленки в биологических повторениях было воспроизводимым; однако с увеличением степени созревания биопленки процент клеток с нарушенной мембраной увеличивался. Все протестированные суспензии Cupral® были высокоэффективны против прикрепленных биопленок на всех стадиях созревания. Суспензии Cupral® C4, C15 и C50 практически полностью отделяют биопленки от поверхностей со значительно более высокой эффективностью по сравнению с образцами, обработанными СНХ ( $P < 0,001$  для C4, C15 и C50). Однако после обработки C15 и C50 двухдневных биопленок незначительные бактериальные агломераты оставались прикрепленными к поверхностям (рис. 3, верхний прямоугольник). Бактериальные клетки в супернатантах биопленок, обработанных Cupral®, не были пригодны для репликации (нежизнеспособны) на твердой питательной среде - образование колоний не было обнаружено.

Для суспензии C4 нерастворенные частицы  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , эквивалентные по размеру бактериальным колониям, затрудняют визуальный контроль. Обработка СНХ вызывала повреждение мембран в 57-94% клеток биопленки (рис. 3, нижний прямоугольник). За исключением двухдневных биопленок, все суспензии Cupral® полностью отделяют биопленки от поверхностей. Оставшиеся клетки после обработки Cupral® показали общую жизнеспособность  $< 1\%$ , оценка с помощью анализа CLSM.

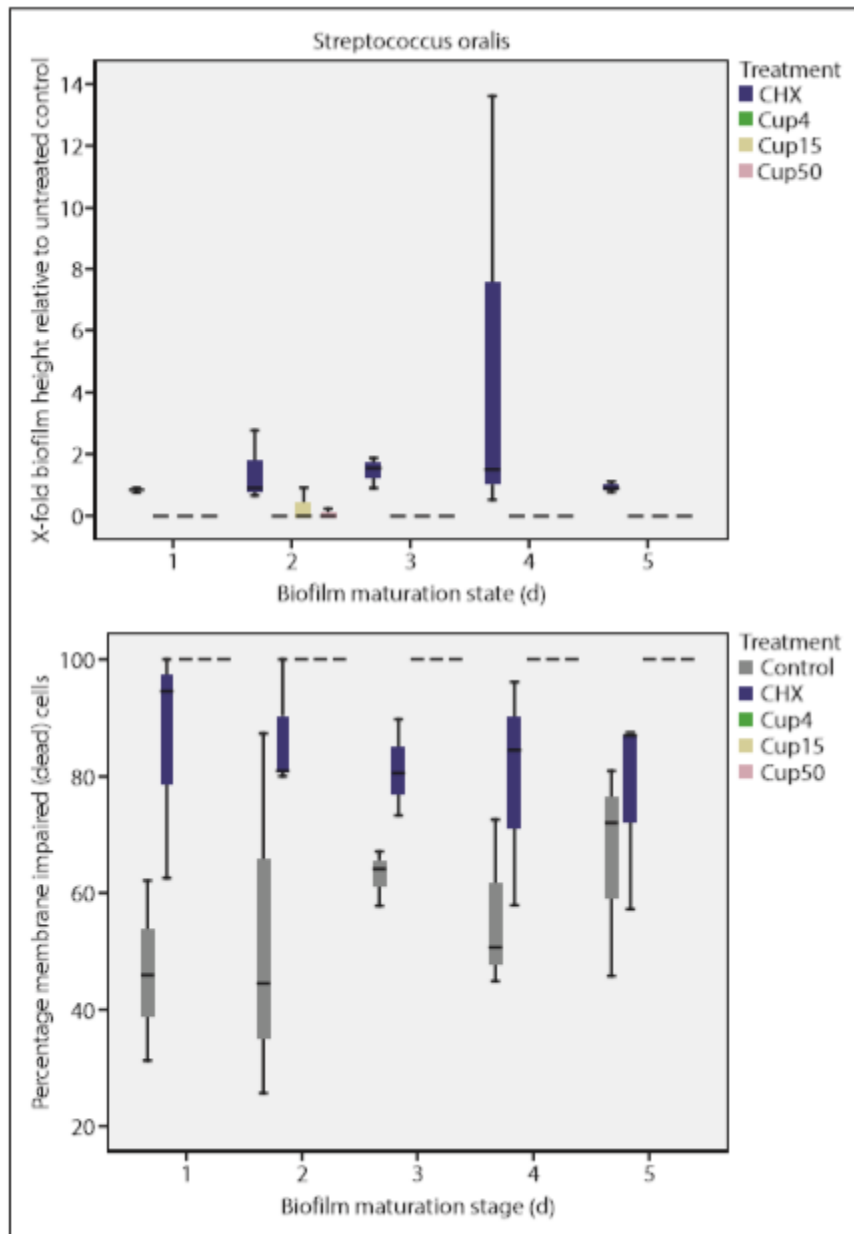


Рис. 3. Диаграммы изображают влияние обработки Cupral® на высоту биопленки и выживаемость клеток биопленок *S. oralis* на разных стадиях созревания; верхний прямоугольник: изменение средней высоты биопленки по сравнению с необработанным контролем в ответ на обработку Cupral® в течение 24 часов; нижний прямоугольник: относительная доля мертвых клеток в биопленках после 24 ч инкубации в суспензии Cupral®

### ***Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

Образование биопленки на поверхности образцов варьировалось между тремя биологическими репликами. Отмечалось либо отслоение биопленки на поздних стадиях созревания биопленки (день 4 и 5), либо задержка начала формирования биопленки, и эффект анти-биопленки не мог быть проанализирован как биологические трипликаты для всех стадий созревания биопленки. Однако обработка С4 и С15 приводила к полному отрыву биопленок на всех тестируемых стадиях созревания, тогда как клеточные агломераты оставались на поверхностях после обработки С50 на 2, 3 и 4 день старых биопленок (рис. 4, верхний прямоугольник). Опять же, лечение СНХ привело к незначительному отслоению или отсутствию биопленки. Разница в проценте мертвых клеток для лечения С50 и СНХ не была статистически значимой (рис. 4, нижний прямоугольник).

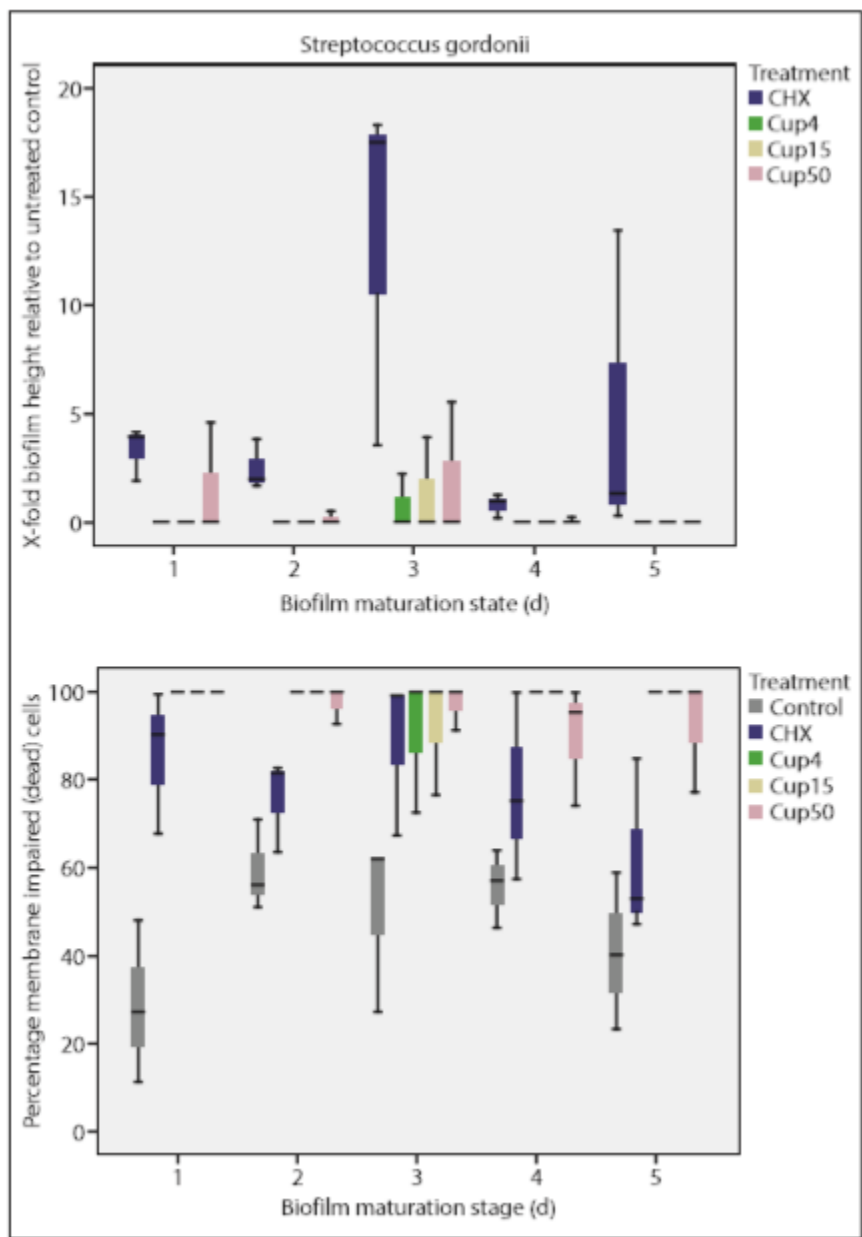


Рисунок 4. Диаграммы изображают влияние обработки Cupral® на высоту биопленки и выживаемость клеток биопленок *S. gordonii*. верхний прямоугольник: изменение средней высоты биопленки по сравнению с необработанным контролем в ответ на обработку Cupral® в течение 24 часов; нижний прямоугольник: относительная доля мертвых клеток в биопленках после 24-часовой инкубации в суспензии Cupral®

## ОБСУЖДЕНИЕ

С медицинской точки зрения обработка биопленки становится все более сложной задачей на более поздних этапах созревания, поскольку архитектура биопленки полностью эволюционировала и обеспечивает надежную защиту от внешних угроз (30). Поэтому антисептический эффект Cupral® оценивали при различных биологических условиях *in vitro*, чтобы определить его эффективность в отношении биопленок на разных стадиях созревания и диапазон эффективной концентрации. Для реалистичной процедуры испытания биопленки были подготовлены таким образом, чтобы они морфологически напоминали те, которые обнаружены в полости рта. Модели проточной камеры широко используются для этой цели (29, 31-33), поскольку считается, что поток жидкости оказывает существенное влияние на процесс формирования (оральный) биопленки. Движение основных масс жидкости является ключевым фактором, влияющим на процессы переноса питательных веществ и удаления отходов, и, важным фактором, влияющим на рост микробов в ротовой полости. Например, напряжение сдвига вызывает компактную морфологию биопленки (34) и увеличивает сцепление с

поверхностями субстрата (35). Что касается экспериментальной воспроизводимости, неспецифические эффекты отрыва, например, вызванного экспериментальным воздействием, можно просто избежать, выбрав подходящую модель *in vitro*. Кроме того, описанный экспериментальный дизайн исключает неспецифическое бактериальное осаждение на поверхностях, поскольку в процессе формирования биопленки принимают участие преимущественно активно прилипающие (жизненно важные) бактериальные клетки. Соответственно, было исключено увеличение накопления мертвых клеток, что могло оказать влияние на наблюдаемые биологические эффекты. Сбор биопленок на разных стадиях созревания был успешно выполнен для всех протестированных видов бактерий. Но очевидные различия между развитием биопленки среди исследуемых видов наблюдаются под микроскопом. Для обоих стрептококков образование биопленки было относительно однородным и воспроизводимым во всех биологических повторениях. Тем не менее, оральная патоген *A. actinomycetemcomitans* показал либо длительную лаг-фазу, либо обширное отслоение биопленки на 4-й и 5-й день. Возможным объяснением последнего эффекта может быть накопление кислых продуктов метаболических отходов. Известно, что *A. actinomycetemcomitans* чувствителен к кислой среде (36). С увеличением биомассы на поверхностях на более поздних стадиях созревания доступные питательные вещества быстрее метаболизируются, что приводит к понижению pH, так как буферная емкость питательного бульона может быть превышена. Оба протестированных вида стрептококков устойчивы к кислой среде (37), так как многие виды рода *Streptococcus* непосредственно участвуют в образовании кариеса или могут находиться в непосредственной близости от ацидогенных видов. Соответственно, изменения pH, возможно, не влияли на рост стрептококков, но отрицательно влияли на пролиферацию *A. actinomycetemcomitans* и вызывали отслоение биопленки при длительном культивировании этого вида. Обработка биопленок Cupral® была эффективна при всех испытанных концентрациях с точки зрения способности отделения биопленки и уничтожения клеток биопленки. При концентрациях C4 и C15 антибактериальная внутриканальная обработка показала наибольший эффект отслоения биопленки. Эффективность обоих активных ингредиентов,  $Cu^{2+}$  и  $Ca(OH)_2$ , хорошо известна (13, 38-40). Часто сообщается о лизисе клеток как следствие сильнощелочной микросреды; однако для полного отделения ячеек и матрицы EPS это не так. Beeton et al. (41) сообщили об антибиопленочной активности органических комплексов меди (II) на зрелых биопленках. Этот эффект был приписан нуклеазной активности металлоорганического комплекса, который нацелен на соединения матрицы EPS. Однако этот эффект не был описан для обработки  $Cu(OH)_2$ . Наблюдаемые эффекты могут быть связаны с комбинированным воздействием сильной щелочной среды и высокой концентрации  $Cu^{2+}$ . Эти результаты подтверждаются эффектом низкоконцентрированных суспензий Cupral® (C50), где отслоение биопленки наблюдается в значительно меньшей степени.

В результате длительного лечения СНХ наблюдалось значительное увеличение объема биопленки. Предыдущие исследования Lee et al. (42), Wang et al. (43) и Ariaz-Moliz et al. (44) не представили доказательств наблюдаемого эффекта. Однако продолжительность лечения составляла либо несколько минут (42-44), либо значительно превышала 24 часа (42). Вероятно, что увеличение биологического объема является реакцией, связанной со стрессом. Мы наблюдали, что он был максимальным для зрелых стрептококковых биопленок в возрасте 3 дня и на более длительном интервале времени. Формирование биопленки - многостадийный процесс (5, 45), заканчивающийся зрелым многослойным бактериальным сообществом. Основным ограничивающим рост шагом является подача питательных веществ и накопление продуктов метаболизма в нижней части биопленки. В этой ситуации бактериальная метаболическая активность в более глубоких слоях биопленки может быть снижена (46, 47). Что касается как стрептококков, так и *A. actinomycetemcomitans*, то самые высокие биологические объемы наблюдались между 3-м и 5-м днем, лечение СНХ могло быть направлено на полностью развитое микробное сообщество. Согласно Hoffman et al. (48) увеличение биомассы может быть вызвано стрессовой реакцией на противомикробные препараты. Таким образом, можно сделать вывод о том, что значительное увеличение



биомассы может быть связано со стрессовой реакцией бактерий в более глубоких слоях биопленок. Они были лучше защищены от воздействия СНХ и, возможно, вызвали массовое производство EPS. Однако из-за большой продолжительности лечения бактерии были убиты в более поздний момент времени при воздействии СНХ, что соответствует низкой выживаемости клеток.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В этом исследовании мы продемонстрировали антисептическую эффективность обработки Cupral® на биопленках орального комменсала, сформированных *in vitro*. Обеззараживающая способность Cupral®, т.е. скорость уничтожения бактерий, была сопоставима с СНХ. Однако разрушение структур биопленки, то есть удаление экстраполимерных веществ, образующихся в результате образования биопленки, наблюдалось только после обработки Cupral®. Исходя из результатов эксперимента, применение растворов Cupral® в качестве антибактериальных средств для полоскания и эндодонтического орошения представляется перспективным подходом для борьбы с патогенными биопленками ротовой полости и возникающими в результате инфекциями.

## **Раскрытие информации**

Конфликт интересов. Авторы подтверждают, что у них нет конфликта интересов.  
Утверждение комитета по этике: Этическое утверждение для данного исследования было дано местным комитетом по этике (№ 4348, Ганноверская медицинская школа, Германия).

Рецензирование: внешне рецензировано.

Раскрытие финансовой информации: Humanchemie GmbH (Альфельд, Германия).

Авторские взносы: Концепция - Н.С.С., М.С. ; Дизайн - Н.С.С., Н.Ф.В.М.; Наблюдение - Н.Ф.В.М., Н.С.С., М.С.; Финансирование - нет; Материалы - Ганноверская медицинская школа; Сбор и / или обработка данных - N.S.S. ; Анализ и / или интерпретация - Н.Ф.В.М., Н.С.С.; Поиск литературы - Н.Ф.В.М., Н.С.С. ; Описание - Н.Ф.В.М., Н.С.С.; Критический обзор - М.С.

## **REFERENCES**

1. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol* 2000 2012; 60(1):15–39.
2. Dumitrescu AL. Editorial: Periodontal Disease - A Public Health Problem. *Front Public Health* 2016;3:278.
3. Watt RG, Petersen PE. Periodontal health through public health--the case for oral health promotion. *Periodontol* 2000 2012; 60(1):147–55.
4. Chen T, Yu WH, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, Dewhirst FE. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford)* 2010;2010:baq013.
5. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8(9):623–33.
6. Römmling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med* 2012; 272(6):541–61.
7. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol* 2017; 15(12):740–55.
8. Grass G, Rensing C, Solioz M. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(5):1541–7.
9. Gosau M, Bürgers R, Vollkommer T, Holzmann T, Prantl L. Effectiveness of antibacterial copper additives in silicone implants. *J Biomater Appl* 2013; 28(2):187–98.
10. Chatterjee AK, Chakraborty R, Basu T. Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology* 2014; 25(13):135101.

11. Ye J, He J, Wang C, Yao K, Gou Z. Copper-containing mesoporous bioactive glass coatings on orbital implants for improving drug delivery capacity and antibacterial activity. *Biotechnol Lett* 2014; 36(5):961–8.
12. Norambuena GA, Patel R, Karau M, Wyles CC, Jannetto PJ, Bennet KE, et al. Antibacterial and Biocompatible Titanium-Copper Oxide Coating May Be a Potential Strategy to Reduce Periprosthetic Infection: An In Vitro Study. *Clin Orthop Relat Res* 2017; 475(3):722–32.
13. Goudouri OM, Kontonasaki E, Lohbauer U, Boccaccini AR. Antibacterial properties of metal and metalloid ions in chronic periodontitis and periimplantitis therapy. *Acta Biomater* 2014; 10(8):3795–810.
14. Yoshida Y, Furuta S, Niki E. Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1210(1):81–8.
15. Dudev T, Lim C. Competition among metal ions for protein binding sites: determinants of metal ion selectivity in proteins. *Chem Rev* 2014; 114(1):538–56.
16. Macomber L, Imlay JA. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(20):8344–9.
17. Hermann BW. Calciumhydroxid als Mittel zum Behandeln und Füllen von Wurzelkanälen. Würzburg: Julius-Maximilians-Universität (JMU) Würzburg; 1920.
18. Roger GB, Vincent EB, Edgar RS. Calcium Hydroxide as a Highly Alkaline pH Standard. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*. 1956; 56(6):305–12.
19. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999; 32(5):361–9.
20. KG M. Sicherheitsdatenblatt. Merck KG; 2014. p. 19.
21. Aper T, Wilhelmi M, Gebhardt C, Hoeffler K, Benecke N, Hilfiker A, et al. Novel method for the generation of tissue-engineered vascular grafts based on a highly compacted fibrin matrix. *Acta Biomater* 2016;29:21–32.
22. Carrotte P. Endodontics: Part 9. Calcium hydroxide, root resorption, endoperio lesions. *Br Dent J* 2004; 197(12):735–43.
23. Kim D, Kim E. Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review - Part II. in vivo studies. *Restor Dent Endod* 2015; 40(2):97–103.
24. Weiger R, Rosendahl R, Löst C. Influence of calcium hydroxide intracanal dressings on the prognosis of teeth with endodontically induced periapical lesions. *Int Endod J* 2000; 33(3):219–26.
25. van der Waal SV, van der Sluis LW, Özok AR, Exterkate RA, van Marle J, Wesselink PR, et al. The effects of hyperosmosis or high pH on a dualspecies biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa*: an in vitro study. *Int Endod J* 2011; 44(12):1110–7.
26. Guo W, Quah SY, Lim KC, Yu VS, Tan KS. Cysteamine Enhances Biofilm Eradication Efficacy of Calcium Hydroxide. *J Endod* 2016; 42(5):742–6.
27. Kalchinov V, Dimitrov SI, Belcheva M. In vitro study of bactericidal effect of antimicrobial agents used in modern endodontics. *Journal of IMAB – Annual Proceeding (Scientific Papers)* 2009; 15(2):79–83
28. Kommerein N, Doll K, Stumpp NS, Stiesch M. Development and characterization of an oral multispecies biofilm implant flow chamber model. *PLoS One* 2018; 13(5):e0196967.
29. Rath H, Stumpp SN, Stiesch M. Development of a flow chamber system for the reproducible in vitro analysis of biofilm formation on implant materials. *PLoS One* 2017; 12(2):e0172095.
30. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35(4):322–32.
31. Verkaik MJ, Busscher HJ, Rustema-Abbing M, Slomp AM, Abbas F, van der Mei HC. Oral biofilm models for mechanical plaque removal. *Clin Oral Investig* 2010; 14(4):403–9.
32. Foster JS, Kolenbrander PE. Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(7):4340–8.
33. Darrene LN, Cecile B. Experimental Models of Oral Biofilms Developed on Inert Substrates: A Review of the Literature. *Biomed Res Int* 2016;2016:7461047.
34. Cao YS, Alaerts GJ. Influence of reactor type and shear stress on aerobic biofilm morphology, population and kinetics. *Water Research* 1995; 29(1):107–18.
35. Lecuyer S, Rusconi R, Shen Y, Forsyth A, Vlamakis H, Kolter R, et al. Shear stress increases the residence time of adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophys J* 2011; 100(2):341–50.
36. Bhattacharjee MK, Childs CB, Ali E. Sensitivity of the periodontal pathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* at mildly acidic pH. *J Periodontol* 2011; 82(6):917–25.
37. Banas JA, Zhu M, Dawson DV, Blanchette DR, Drake DR, Gu H, et al. Acidogenicity and acid tolerance of *Streptococcus oralis* and *Streptococcus mitis* isolated from plaque of healthy and incipient caries teeth. *J Oral Microbiol* 2016;8:32940.
38. Nostro A, Cellini L, Di Giulio M, D'Arrigo M, Marino A, Blanco AR, et al. Effect of alkaline pH on staphylococcal biofilm formation. *APMIS* 2012; 120(9):733–42.
39. Brändle N, Zehnder M, Weiger R, Waltimo T. Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. *J Endod* 2008; 34(5):579–82.
40. Chavez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod* 2007; 33(6):652–62.
41. Beeton ML, Aldrich-Wright JR, Bolhuis A. The antimicrobial and antibiofilm activities of copper(II) complexes. *J Inorg Biochem* 2014; 140:167–72.

42. Lee JH, Jo YW. Antimicrobial Effect of a Lauric Acid on Streptococcus Mutans Biofilm. *Annals of International Medical and Dental Research* 2016; 2(4):60–5.
43. Wang Z, de la Fuente-Núñez C, Shen Y, Haapasalo M, Hancock RE. Treatment of Oral Multispecies Biofilms by an Anti-Biofilm Peptide. *PLoS One* 2015; 10(7):e0132512.
44. Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, García García E, Hungaro Duarte MA, et al. Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against Enterococcus faecalis biofilms. *Int Endod J* 2015; 48(12):1188–93.
45. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res* 2009; 88(11):982–90.
46. Sternberg C, Christensen BB, Johansen T, Toftgaard Nielsen A, Andersen JB, Givskov M, et al. Distribution of bacterial growth activity in flowchamber biofilms. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65(9):4108–17.
47. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284(5418):1318–22.
48. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 2005; 436(7054):1171–5.