

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

(Direktor: Prof. Dr. Matthias Hannig)

**Untersuchung der In-situ-Pellikelbildung
auf verschiedenen Substraten
mittels AFM, TEM und Ellipsometrie**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2011

vorgelegt von: Ines Elise Kraus

geb.am: 23.12.1981 in Neunkirchen

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY	6
2	EINLEITUNG	8
2.1	Einführung	8
2.2	Pellikel: initialer oraler Biofilm	10
2.2.1	Pellikel: Definition und Bildung	10
2.2.2	Zusammensetzung und struktureller Aufbau	12
2.2.3	Funktion des Biofilms	17
2.2.4	Verfahren zur Untersuchung der Pellikel	19
2.3	Vorstellung verschiedener Analysemethoden	23
2.3.1	AFM (Rasterkraftmikroskopie)	23
2.3.2	TEM (Transmissionselektronenmikroskop)	28
2.3.3	Ellipsometrie	32
2.4	Zielsetzung	37
3	MATERIAL UND METHODEN	38
3.1	AFM-Studie zur Pellikelmorphologie	38
3.1.1	Substratbeschreibung und Herstellung der Proben	38
3.1.2	Die In-situ-Pellikelbildung	39
3.1.3	Fixierung und Vorbereitung zur AFM-Messung	40
3.1.4	Beschreibung der AFM-Messung	41
3.2	Ellipsometrische Analyse der Pellikelbildung auf verschiedenen Substraten	43
3.2.1	Substratbeschreibung und Herstellung der Proben	43
3.2.2	Die In-situ-Pellikelbildung	43
3.2.3	Fixierung und Vorbereitung zur ellipsometrischen Messung	43
3.2.4	Beschreibung der Messung mit dem Ellipsometer	44

3.3	Methodenvergleich AFM, Ellipsometer und TEM	46
3.3.1	Substratbeschreibung und Herstellung der Proben	46
3.3.2	Die In-situ-Pellikelbildung	46
3.3.3	Fixierung und Vorbereitung zur Messung	46
3.3.4	Beschreibung der Analysen mit dem AFM, dem Ellipsometer und dem TEM	47
3.4	Überblick	49
3.5	Statistik	49
4	ERGEBNISSE	50
4.1	AFM-Studie zur Pellikelmorphologie	50
4.1.1	AFM-Analyse der Pellikelbildung auf bukkal getragenen Platin-Araldit-Proben	50
4.1.2	AFM-Analyse der Pellikelbildung auf palatinal getragenen Platin-Araldit-Proben	56
4.1.3	AFM-Analyse der Pellikelbildung auf bukkal getragenen Siliziumoxid-Proben	61
4.1.4	AFM-Analyse der Pellikelbildung auf palatinal getragenen Siliziumoxid-Proben	64
4.1.5	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse	70
4.2	Ellipsometrische Analyse der Pellikelbildung auf verschiedenen Substraten	79
4.2.1	Vergleich Siliziumoxid-Wafer vs. OTS-beschichteter Siliziumoxid-Wafer (hydrophil vs. hydrophob)	79
4.3	Methodenvergleich AFM, Ellipsometer und TEM	83
4.3.1	Methodenvergleich am Beispiel der bukkalen 30-min-Pellikel der Probandin KH	83
4.3.2	Methodenvergleich am Beispiel der palatinalen 30-min-Pellikel der Probandin KH	85
4.3.3	Methodenvergleich am Beispiel der bukkalen 30-min-Pellikel der Probandin IK	87

4.3.4	Methodenvergleich am Beispiel der palatinalen 30-min-Pellikel der Probandin IK	89
5	DISKUSSION	91
5.1	Diskussion von Material und Methoden	91
5.1.1	Herstellung der Prüfkörper	91
5.1.2	Die In-situ-Pellikelbildung	92
5.1.3	Fixierung und Vorbereitung zur Messung	92
5.2	Diskussion der AFM-Studie zur Pellikelmorphologie	94
5.2.1	Diskussion der Ergebnisse des Substratvergleichs	94
5.2.2	Diskussion der Ergebnisse beim Vergleich der Expositionszeiten	97
5.2.3	Diskussion der Ergebnisse bezüglich des Probandenvergleichs	99
5.2.4	Diskussion der Ergebnisse des Lokalisationsvergleichs	101
5.3	Diskussion der ellipsometrischen Analyse der Pellikelbildung auf verschiedenen Substraten	104
5.4	Diskussion des Methodenvergleichs von AFM, Ellipsometrie und TEM	106
5.4.1	Stimmen die Ergebnisse der drei Messmethoden überein?	106
5.4.2	Welche Unterschiede gibt es zwischen den Methoden?	108
5.4.3	Wo liegen Schwierigkeiten und Fehlerquellen?	109
5.4.4	Genügt die Auswertung mittels einer Messmethode?	112
6	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	113
7	LITERATURVERZEICHNIS	115
8	ANHANG	127
8.1	Tabellen zu den Ellipsometriemessungen aus Kap. 4.2	127
8.2	Tabelle zu den Ellipsometriemessungen aus Kap. 4.3	130
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	131

10	DIAGRAMMVERZEICHNIS	134
11	TABELLENVERZEICHNIS	135
12	DANKSAGUNG	136

1 ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY

Der bakterielle Biofilm ist Ursache für die weit verbreiteten dentalen Krankheitsbilder Karies und Parodontopathien. Aus vorhergehenden Studien ist bekannt, dass die initiale Proteinadsorption aus dem Speichel an der Zahnoberfläche frisch geputzter Zähne ursächlich für den sich weiter anheftenden bakteriellen Biofilm ist. Diese Proteinadsorption findet nicht nur auf dem Schmelz statt, sondern auf allen Oberflächen, die dem intraoralen Milieu ausgesetzt sind. Die Ursachen dieses Phänomens sind noch nicht endgültig entschlüsselt.

In dieser In-vivo-Studie wurde die intraoral stattfindende initiale Pellikeladsorption auf einer geeigneten Auswahl von Substraten mit drei unterschiedlichen Methoden untersucht. Siliziumoxid-Wafer, OTS-Wafer und Pt-Araldit wurden als Prüfkörpermaterial eingesetzt. Die Prüfkörper wurden bukkal und palatinal des ersten oberen Molaren an einer Trageschiene befestigt und dem intraoralen Milieu von verschiedenen Probanden ausgesetzt. Als intraorale Expositionszeit der Substrate wurden Perioden von 3 min, 30 min und 120 min gewählt. Die Morphologie und Ultrastruktur der nach diesen intraoralen Expositionszeiten in-vivo gebildeten initialen Pellikelschicht wurde mit den Methoden Rasterkraftmikroskopie (AFM), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Ellipsometrie analysiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die initiale Pellikelbildung auf allen ausgewählten Substraten stattfand, und ein Einfluss der Substratoberfläche auf die Pellikeladsorption wurde bestätigt. Die Pellikel bildete sich probandenunabhängig auf vielen Oberflächen und es gab intraoral lokalisationsbedingte Unterschiede in der Pellikelmorphologie. Mit steigender intraoraler Expositionszeit wurden im zeitlichen Ablauf der Pellikelbildungs- und Umbauprozesse unterschiedliche Schichtdicken der Pellikel auf den Prüfkörpern beobachtet.

Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Studie die technischen Möglichkeiten verschiedener physikalischer Messmethoden, die uns Informationen zur Pellikel liefern können, verglichen. Es wurde gezeigt, dass nur eine Kombination der Ergebnisse der genutzten Messmethoden ein umfassendes Bild der intraoral gewonnenen Pellikel erzielen kann.

SUMMARY

The bacterial biofilm causes the widely spread dental diseases caries and periodontitis. The initial protein adsorption from saliva onto the tooth's surface subsequently to tooth brushing is the starting point of the following adsorption of the bacterial biofilm as previous studies show. Protein adsorption, however, does not only take place on enamel but also on all surfaces that are exposed to the intraoral milieu. The details of this phenomenon, however, have not been clarified, yet.

Using an appropriate selection of materials, the present in-vivo-study analysed the initial pellicle adsorption that takes place intraorally by means of three different methods. A silicon wafer, an OTS-wafer, and Pt-araldite were used as test specimens. Test pieces were mounted to intraoral appliances at the buccal and palatal sites of the upper first molars and were exposed to the oral environment of the different volunteers. As intraoral exposure time of test specimens, periods of 3 min, 30 min and 120 min were chosen. Morphology and ultrastructure of the in-vivo formed salivary pellicle layer after these intraoral exposure times were analysed by atomic force microscopy (AFM), transmission electron microscopy (TEM) and ellipsometry.

The results of this study show that the initial pellicle adsorption took place on all selected substrates and that an influence of the substrate on the pellicle adsorption existed. On the surfaces tested pellicle formation was independent of the volunteers and there were differences in the pellicle morphology dependent to the different intraoral localisations. With increasing intraoral exposure time the pellicle layer on the test specimen showed a different thickness in the course of the pellicle formation and maturation processes.

The present study, furthermore, compared the technical possibilities of various physical methods which can deliver informations about the pellicle. It has been shown that a complete picture of the intraorally formed pellicle was reached only by a combination of the results from the different methods used.

2 EINLEITUNG

In dieser Studie wird die initiale intraorale Biofilmbildung mit verschiedenen Messmethoden untersucht. Im Mittelpunkt steht die Analyse der ultra-morphologischen Struktur der Pellikel. Die Pellikelproben werden an unterschiedlichen Lokalisationen in der Mundhöhle gewonnen. Ein weiterer Schwerpunkt liegt in dem Vergleich der genutzten Messmethoden Rasterkraftmikroskopie, Ellipsometrie und Transmissionselektronenmikroskopie.

2.1 Einführung

Im flüssigen Milieu biologischer Systeme existieren Biopolymere, Mikroorganismen und Zellen in großer Zahl. Die Theorie besagt, dass die Mehrheit der Bakterien in einer Matrix innerhalb von Wasser-Ökosystemen wächst (Costerton et al. 1978). Die belegenden Daten dieser Theorie kommen in der Regel aus dem Bereich der natürlichen Wasser-Ökosysteme. Mikroskopische Beobachtungen und Untersuchungen mit anderen Messmethoden belegen, dass mehr als 99,9% der Bakterien in Biofilmen auf vielen unterschiedlichen Oberflächen wachsen (Rodney et al. 2002). Die Biopolymere zeichnen sich durch ihre polaren und apolaren Gruppen sowie aufgrund verschiedenartiger Seitenketten durch ein stark ausgeprägtes amphiphiles Verhalten aus. Dies verleiht ihnen die Fähigkeit, an Grenzflächen zu adsorbieren (Horbett 1982). Die Biopolymere besitzen eine höhere Diffusionsgeschwindigkeit als Mikroorganismen und Zellen und stellen daher die präadsorbierte Schicht dar. Viele verschiedene biologische Prozesse basieren auf der Proteinadsorption an Grenzflächen, beispielsweise die Komplementaktivierung des Immunabwehrsystems oder auch die Blutaggregation (Horbett 1982). Die bakterielle und zelluläre Adhärenz an Festkörperoberflächen wird durch die Charakteristika der Biopolymerschicht beeinflusst (Norde 1984).

Auch im Bereich der Festkörperphysik spielen diese Prozesse eine große Rolle. Es wird an Oberflächenbeschichtungen geforscht, um beispielsweise im medizinischen Bereich in der Implantatentwicklung oder bei der Materialauswahl von Kathetern den Mikroorganismen keine oder nur geringe Möglichkeiten zur Adhärenz zu bieten.

Im zahnmedizinischen Bereich ist die Adhärenz von Biopolymeren und Mikroorganismen für die beiden häufigsten dentalen Krankheitsbilder Karies und Parodontopathien verantwortlich. Die genaue Kenntnis der initialen Biofilmbildung ist in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse. Die Modifizierung dieser Biopolymerschicht könnte eine interessante Möglichkeit darstellen, die pathologischen Konsequenzen der bakteriellen Adhärenz zu verändern. Die Erforschung der Bioadhäsionsprozesse stellt jedoch eine große Herausforderung dar. Die zu untersuchenden Biofilme aus adsorbierten Proteinen bewegen sich in den Größenordnungsbereichen von nur wenigen Nanometern. Große Fortschritte bei der Erforschung der Oberflächen von natürlichen oralen Biofilmen sind in der Vergangenheit durch den Einsatz des Elektronenmikroskops erzielt worden (Frank 1980). Mittlerweile gibt es mehrere Messverfahren, mit denen auch im Nanometerbereich gemessen werden kann. Die Untersuchungen mit dem Rasterkraftmikroskop, dem Transmissionselektronenmikroskop und dem Ellipsometer geben jeweils mit besonderer Schwerpunktsetzung Auskunft über die Struktur des Biofilms.

2.2 Pellikel: initialer oraler Biofilm

2.2.1 Pellikel: Definition und Bildung

Das erworbene Zahnoberhäutchen, erstmals von Dawes et al. (1963) als „acquired pellicle“ benannt, wird als organischer Film beschrieben, der sich nach dem Zahndurchbruch auf der Zahnoberfläche bildet. Schon frühere Studien von Schüle (1961) beschäftigten sich mit dem Phänomen des „Schmelzoberhäutchens“ und auch Meckel (1965) und Sönju (1986) untersuchten die Bildung und Eigenschaften dieses organischen Films. Die Pellikel ist nach Hannig M. und Joiner (2006) eine aus adsorbierten Proteinen und Makromolekülen der oralen Mundflora bestehende azelluläre und zudem bakterienfreie Membran.

Die Bildung der Pellikel auf vollständig gereinigtem Zahnschmelz setzt innerhalb von Sekunden ein und ist nach ein bis zwei Stunden abgeschlossen (Skjörland et al. 1995). Die durchschnittliche Dicke der Pellikel beträgt nach einer Studie von Hannig M. und Joiner (2006) 100-200 nm.

Die Makromoleküle aus dem Speichel reagieren über elektrostatische Anziehungskräfte geladener Gruppen, Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Interaktionen mit der Schmelzoberfläche (Hannig M. 1998).

Der erste Schritt der Pellikelbildung erfolgt über elektrostatische Wechselwirkungen der geladenen Gruppen von Speichelproteinen und der geladenen Doppelschicht des Schmelzes aus Calcium- und Phosphat-Ionen (Hannig M. und Joiner 2006). Die Schichtdicke dieser initialen Schicht bewegt sich laut Hannig M. (1999) zwischen 10 und 20 nm.

Die Pellikelbildung wird als ein dynamischer Prozess betrachtet, bei dem eine kontinuierliche Remodelierung durch chemische und enzymatische Modifikationen der adsorbierten Proteine beziehungsweise durch intermolekulare Vorgänge mit anderen Speichelproteinen stattfindet (Nekrashevych 2001).

Eine weitere Studie von Hannig M. (1997) ergab, dass sich pellikelartige Strukturen nicht nur auf dem Zahnschmelz befinden, sondern auf allen organischen und anorganischen Oberflächen, die dem Mundhöhlenmilieu ausgesetzt sind.

Die Pellikelbildung vollzieht sich nach einer Untersuchung von Glantz (1979) auf allen Oberflächen gleich schnell und eine In-vitro-Studie von Vassilakos et al. (1993) bestätigte die stattfindende Pellikelbildung auf festen und flüssigen Oberflächen. Nach Baier und Glantz (1978) bestehen dabei jedoch Adsorptionsunterschiede auf Oberflächen unterschiedlicher Oberflächenenergie. In einer Studie von Arvidsson et al. (2004) wurden Materialien mit unterschiedlicher Oberflächenenergie zum einen dem Parotisspeichel und zum anderen dem Speichel der Submandibular- und Sublingualdrüsen ausgesetzt. Die Ergebnisse zeigten eine Abhängigkeit der Pellikelbildung bezüglich der Expositionszeit, der Speichelzusammensetzung und der Oberflächenenergie der Proben. Die Abhängigkeit der Pellikelbildung und der Pellikelzusammensetzung von der Oberflächenenergie des Substrates wurde in einer Studie von Hannig M. et al. (2007) bestätigt. In dieser In-situ-Studie wurde erstmals dokumentiert, dass die Beschichtung von Schmelz und Titan mit einer Nano-Composite-Schicht, die die Oberflächenenergie der Materialien herabsetzt, ausreicht, um eine Reduzierung der Biofilmanlagerung zu erzielen (Hannig M. et al. 2007).

Eine weitere Studie von Quinn et al. (2008) untersuchte die Kinetik der Proteinadsorption von Amylase auf festen und flüssigen Substraten und zeigte, dass nicht nur die chemischen Oberflächenbestandteile die Eigenschaften des adsorbierten Proteinlayers bestimmen, sondern dass auch die Van-der-Waals-Kräfte und deren Verteilung in dem Substrat eine nicht unerhebliche Rolle spielen. Nach einer 5-minütigen Speichelkontamination lässt sich anhand der veränderten oberflächenaktiven Eigenschaften eindeutig das Vorhandensein einer organischen Deckschicht auf allen Werkstoffen nachweisen, so dass die Benetzbarkeit der Oberflächen nicht mehr nur von spezifischen Werkstoffeigenschaften, sondern auch von den oberflächenaktiven Eigenschaften der Pellikel bestimmt wird (Lockowandt et al. 1991). Eine weitere Studie von Hannig M. et al. (2004) erzielte ähnliche Ergebnisse und bestätigte diese Annahme.

Die initiale Pellikelbildung hat Konsequenzen für die folgende bakterielle Adhärenz. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Schmelzoberfläche und der Oberfläche zum Beispiel auch zahnärztlicher Restaurationen werden verändert (Hannig M. 1998). Eine Studie von Groessner-Schreiber et al. (2004) beschäftigte sich beispielsweise mit der Untersuchung verschiedener Implantatmaterialien bezüglich der bakteriellen Adhärenz und fand mittels mo-

lekular-biologischer Methoden auf rein Titan-beschichtetem Glas höhere Bakterienmengen als auf Nickeltitan- oder Nickelzirkon-beschichtetem Glas. Letztlich stellt sich aus wissenschaftlicher Sicht bei der Definition der initialen Pellikel, die bakterienfrei sein sollte, die Frage, ob diese Differenzierung zwischen dem initialen Proteinspeichelfilm und der dreidimensionalen bakteriell besiedelten Polysaccharid-Matrix in natürlichem Mundhöhlenmilieu überhaupt möglich ist. Eine Studie von Hannig M. und Hannig C. (2007) beschäftigte sich mit dieser Fragestellung und zeigte, dass ein in-vivo gebildeter bakterienfreier Biofilm eigentlich nicht existent ist. Aus rein wissenschaftlichem Blickwinkel hat sich diese Unterscheidung jedoch als sinnvoll erwiesen.

2.2.2 Zusammensetzung und struktureller Aufbau

Die Pellikelbildung ist das Ergebnis einer schnellen Adsorption von Biopolymeren und setzt sich aus Komponenten des Speichels, des Zahnsulkus, des Blutes, verschiedener Bakterienbestandteile, der Mundschleimhaut und eventuell auch aus Speiseresten zusammen (Hannig M. und Joiner 2006). Eine Studie von Siqueira et al. (2007) identifizierte mittels LC-ESI-MS/MS (Liquid Chromatographie-electrospray ionisation-Mass Spectrometry) ca. 130 verschiedene Pellikelproteine. Für die Bildung der Pellikel stehen im Speichel neben den sezernierten Proteinen und Glykoproteinen auch Immunglobuline, Plasmaproteine, Blutgruppensubstanzen und Enzyme zur Verfügung (Hannig M. und Joiner 2006).

Die Hauptbestandteile der Pellikel sind Speichelproteine. Die Phosphoproteine wie beispielsweise Statherin, Histatin und die prolinreichen Proteine (PRP`s) haben eine hohe Bindungsaffinität zur Hydroxylapatitoberfläche des Schmelzes und sind unter den ersten sich anlagernden Bestandteilen, da sie in Wechselwirkung mit dem Phosphat-Ion des Schmelzes treten können (Hannig M. und Joiner 2006).

Mittels Elektrophorese und der Western-Blott-Technik wurden von Vacca-Smith und Bowen (2000) mehr als 10 verschiedene Proteine in der initialen Pellikel nachgewiesen, wie zum Beispiel die Präsenz von Speichelmuzinen (MG1, MG2), Glykoprotein 1 und 2, Amylase, Histatin, Statherin, verschiedene Isoformen von Cystatin, Lysozyme, Laktoferrin, Carboanhydrase 1 und 2 sowie bakterielle Glykosyltransferase (GTF). Eine ältere Studie von Al-Hashimi und

Levine (1989) beschäftigte sich mit der in-vivo gebildeten 2-h-Pellikel und deren Proteingehalt. Als Hauptbestandteile kommen Amylase, Cystatin, Muzin sowie Immunglobulin A vor. In der 2-h-Pellikel werden jedoch größere Mengen der glykolysierten Amylase und nur Cystatin SA-1 und das Muzin MG1 gefunden, was darauf hinweist, dass nur einige spezielle Vertreter der Speichelproteinfamilie in der frühen Pellikel enthalten sind und die verschiedenen Komponenten der Proteinfamilien unterschiedliche Funktionen in der Mundhöhle übernehmen (Al-Hashimi und Levine 1989). Die Enzymaktivität der in der Pellikel gebundenen GTF wird ebenfalls in Studien von Schilling und Bowen (1988) sowie Scheie et al. (1987) belegt. Eine weitere Studie von Hannig C. et al. (2008) untersuchte die Pellikel nach dem Auftreten der drei Glucosyltransferasen B, C und D, die einen Virulenzfaktor für die Anheftung von Mutans-Streptokokken darstellen. Es finden sich alle drei Isoformen in der Pellikel, wobei GTF D die am meisten detektierte Isoform ist. Die bukkal gewonnene Pellikel zeigt in TEM-Schnitten mehr adsorbierte GTF-Moleküle als die palatinal gewonnene Pellikel, aber alle Pellikel zeigen GTF-Aktivität (Hannig C. et al. 2008).

Eine neuere Studie von Vitorino et al. (2008) identifizierte mittels dem MALDI-Verfahren (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) und MS (Mass Spectrometry) mehr als 90 Peptide und Proteine in der Pellikel und unter anderem ebenso die gängigen Speichelproteine, beispielsweise Statherin, Histatin, Cystatin und die sauren sowie basischen PRP's. Außerdem wird eine Beeinflussung der Pellikel in Zusammensetzung und Bildung von der proteolytischen Aktivität angenommen (Vitorino et al. 2008). In einer weiteren Studie zur Pellikelzusammensetzung wurden ebenso die Plasmakomponenten Fibrinogen, Fibronectin, Albumin und Ig G gefunden (Hannig M. und Joiner 2006).

Die Pellikel enthält auch einige Kohlenhydrate, vor allem in Form von Glucose und Galaktose (Sönju et al. 1974). Aber auch Mannose, Fructose, Glucosamin und Galaktosamin wurden von Mayhall und Butler (1976) nachgewiesen.

In einer Untersuchung des Lipidanteiles einer natürlich beziehungsweise experimentell gebildeten Pellikel konnten auch neutrale Lipide, Cholesterin, Triglyceride sowie Glyko- und Phospholipide charakterisiert werden (Slomiany et al. 1986).

Die Aminosäurezusammensetzung der Pellikel wird durch hohe Anteile von Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Serin und Prolin gekennzeichnet. Die analysier-

ten Aminosäuresequenzen gaben aber keine Auskunft über die Anzahl oder die Qualität der Proteine in der Pellikel, sondern nur über die Unterschiede oder die Gleichheit der gesamten Pellikelzusammensetzung. Der 3-min-Pellikelfilm setzte sich aus gleichen Aminosäuresequenzen unabhängig von der intraoralen Lokalisation zusammen. Man kann daraus folgern, dass die initiale Pellikelbildung ein spezifischer Prozess ist, an dem nur einige spezifische Proteine mit hoher Bindungsaffinität zur Schmelzoberfläche beteiligt sind (Hannig M. und Joiner 2006).

Man spricht von einem zweiphasigen Prozess der Pellikelbildung. Das Aminosäureprofil der adsorbierten Pellikel innerhalb der zweiten Phase der Pellikelbildung, die nach ungefähr 30 Minuten einsetzt, variiert in der Zusammensetzung (Skjörland et al. 1995). Der schnellen initialen Phase der Pellikeladsorption folgt also eine langsamere Phase der Anlagerung auf die schon mit Protein bedeckte Oberfläche (Hannig M. und Joiner 2006).

Die Analyse der Aminosäuren der Pellikel zeigte, dass auf verschiedenen Materialien in-vivo gebildete Pellikel geringe, aber definierte Unterschiede in ihrer Zusammensetzung haben. Die Aminosäurezusammensetzung der Pellikel auf Polyesterstreifen und Glas war in einer Studie von Sönju und Rölla (1972) beispielsweise im Detail unterschiedlich. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Oberfläche von Festkörpern sind für die Adsorption spezifischer Proteine anscheinend entscheidend.

Bei Betrachtung der Pellikelbildung auf Milchzähnen im Vergleich zu permanenten Zähnen wurden Unterschiede hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung und der Ultrastruktur gefunden. Die 2-h-Pellikel auf Milchzähnen wies einen höheren Gehalt an Serin und Glycin und weniger an Tyrosin auf. Der Biofilm erschien im TEM nach 2 h eher homogen und zeigte weniger globuläre Strukturen als der Biofilm auf permanenten Zähnen, was an dem geringeren Proteingehalt des kindlichen Speichels liegen könnte (Sönju Clasen et al. 1997).

In einer Studie von Young et al. (1999) wurde beschrieben, dass die Aminosäurezusammensetzung von mizellenartigen Strukturen im Speichel mit der in-vivo gebildeten 2-h-Pellikel übereinstimmt. Diese mizellenartigen Strukturen scheinen demnach Bestandteile der initialen Pellikel zu sein.

Es finden zusätzliche Wechselwirkungen zwischen den Proteinen des Speichels statt und es kommt zu Komplexbildungen zwischen den Speichelmuzinen und anderen Speichelproteinen. Diese Komplexe werden entweder vor oder nach der Adsorption an die Hydroxyloberfläche des Schmelzes gebildet (Vitkov et al. 2004). Diese Komplexe beinhalteten nach einer Studie von Iontcheva et al. (1997) nicht-kovalente Bindungen von Amylase, Histatin, Statherin, Cystatin und Lysozym zu dem Speichelmuzin MG1. Auch das Enzym Transglutaminase soll nach Yao et al. (2000) eine wichtige Rolle bei der Bildung dieser Komplexe spielen. Eine frühere Studie von Bradway et al. (1992) beschäftigte sich mit Interaktionen zwischen Speichelbestandteilen und der bukkalen Schleimhaut. In der sich in-vivo bukkal bildenden Schleimhautpellikel waren zum Beispiel ebenso MG1 und MG2, Amylase, Speichelcystatin und prolinreiche Proteine zu finden. Es finden auch dort enzymatische Vernetzungsvorgänge statt, bei denen das aus der Schleimhaut sezernierte Transglutaminase-Enzym scheinbar maßgeblich beteiligt ist.

Die Pellikel setzt sich augenscheinlich also nicht nur aus einzelnen Proteinen, sondern zusätzlich auch aus heterogenen Komplexen zusammen, die die Funktion der Pellikel letztlich wahrscheinlich auch beeinflussen.

Die mizellenartigen Strukturen und die heterogenen Komplexe werden als „Supramolecular pellicle precursor“ beschrieben (Vitkov et al. 2004).

Die in-situ gebildete Pellikelschicht zeigt in Perioden von 30-120 min eine netzartige Oberflächenstruktur mit adsorbierten globulären Strukturen mit Durchmesser von 80-200 nm (Hannig M. et al. 2001). Diese Beobachtungen bestätigen die Annahme, dass die Pellikelbildung eher durch Anlagerung von Proteinagglomeraten verursacht wird, als durch die Adsorption einzelner Biopolymere. Unter In-vivo-Bedingungen ist der Zahnschmelz dem gesamten Speichel und deren proteolytischer Aktivität ausgesetzt. Heterogene Komplexbildungen und enzymatische Vernetzungen beeinflussen die Eigenschaften der Speichelproteine und somit die strukturelle Zusammensetzung der Pellikel.

In einem Übersichtsartikel von Hannig C. et al. (2005) wurden die Speichelenzyme Amylase, Lysozym, Peroxidase, Carboanhydrase, Phosphatase, das aus den Zellwänden sezernierte Enzym Transglutaminase sowie die bakteriellen Enzyme Glykosyltransferase und Fruktosyltransferase als Bestandteile der Pellikel beschrieben. Lysozym und Amylase sind die meist gebundenen aktiven,

enzymatischen Komponenten in der Pellikel. Eine Studie von Hannig C. et al. (2009) untersuchte mittels fluorimetrischer Analyse die Beeinflussung der Pellikel durch Lysozym. Lysozym gehört zur Gruppe der schützenden Enzyme innerhalb der Pellikel. Die Enzymaktivität des in der Pellikel immobilisierten Lysozyms zeigt beispielsweise eine unterschiedliche Aktivität verglichen mit dem freien Speichellysozym, was durch eine Konformitätsänderung des Lysozyms bei der Pellikeladsorption bedingt ist. Die Studie testete unter anderem den Einfluss von schwarzem Tee und Chlorhexidin auf die Lysozymaktivität und stellte in beiden Fällen eine Inhibition der Lysozymaktivität in der Pellikel fest (Hannig C. et al. 2009). Eine weitere Studie von Hannig C. et al. (2008) beschäftigte sich mit dem Einfluss der Peroxidase auf die initiale Pellikel. Die Peroxidase ist in allen Schichten der Pellikel homogen verteilt und die enthaltene Molekülmenge nimmt mit steigender Bildungszeit der Pellikel zu. Die Aktivität der immobilisierten Peroxidase ist ebenso nachzuweisen und weist ebenso wie bei Lysozym Konformitätsänderungen bei der Pellikeladsorption auf. Eine spezielle Eigenschaft der Peroxidase scheint eine irreversible Inhibition der Peroxidaseaktivität in der Pellikel mittels Wasserstoffperoxid zu sein (Hannig C. et al. 2008).

Die Enzyme Protease, Elastase und Neuramidase wurden ebenfalls in der Pellikel analysiert. Sie sollen eine Schlüsselrolle bei der späteren bakteriellen Besiedlung spielen und die Zusammensetzung der bakteriellen Pellikel beeinflussen.

Die Oberflächeneigenschaften von zahnärztlichem Material oder enzymatische Vorgänge im Speichel hatten dagegen wenig Einfluss auf die Enzymaktivität in der Pellikel in-situ. Die initiale Pellikel maskiert laut Hannig C. et al. (2006) die physikalischen Eigenschaften von Festkörperoberflächen in der Mundhöhle, so dass die biologische Aktivität unabhängig davon existent ist.

Diese Erkenntnis wurde durch eine weitere In-situ-Studie von Hannig C. et al. (2006) belegt. Die Pellikel auf Titan, Feldspatkeramik sowie Rinderschmelz zeigen keine Unterschiede in der enzymatischen Zusammensetzung von Amylase und Lysozym und auch die Pellikelbildungszeit beeinflusst die Gesamtmenge an Enzym in der Pellikel nicht. Die Amylaseaktivität der immobilisierten Amylase in der Pellikel zeigt hingegen intra- und interindividuelle sowie lokalisationsbe-

dingte Unterschiede (Hannig C et al. 2004). Bukkal und lingual gebildete Pellikel zeigen beispielsweise unterschiedliche Enzymaktivität (Hannig C. et al. 2005). Die Pellikelbildung ist demnach ein dynamischer Prozess, der ständig von adsorbierenden und desorbierenden Vorgängen, komplexbildenden und enzymatischen Vorgängen modifiziert wird. Die in-vivo gebildete Pellikel unterliegt in der oralen Mundflora, im Gegensatz zur In-vitro-Pellikel, einem offenem System mit ständiger Umspülung oraler Flüssigkeiten (Yao et al. 2001).

2.2.3 Funktion des Biofilms

Die Pellikel hat physiologische und pathophysiologische Aufgaben bei den auftretenden Wechselwirkungen zwischen der Zahn-Speichel-Grenzschicht.

Die Hauptfunktion der Pellikel besteht im Schutz und der Konditionierung von Oberflächen in der Mundhöhle. Sie übernimmt lubrikative Funktion und verringert die Abrasionsvorgänge während des Kauvorganges antagonistischer und benachbarter Zähne (Tabak et al. 1982). Zudem besitzt sie eine wichtige kariesprotektive Funktion und bietet Schutz vor Säureattacken (Lendemann et al. 2000). Der Biofilm spielt eine Rolle bei den Remineralisations- und Demineralisationsvorgängen. Vor allem Phosphoproteine beeinflussen den Ionenfluss von Calcium und Phosphat sowie die Diffusion saurer Noxen, indem sie als semipermeable Membran fungieren, und wirken somit inhibierend auf die Schmelzdemineralisation (Juriaanse 1980). Studien von Zahradnik et al. (1976, 1979) sprechen zudem den Speichelmuzinen eine wichtige Rolle bei den Remineralisations- und Demineralisationsprozessen zu. Sie sollen modulierend auf die kinetischen Vorgänge der Pellikelbildung wirken. Die Speichelmuzine MG1 und MG2 besitzen unterschiedliche Affinität zu Hydroxylapatit. Nach Tabak et al. (1985) sollen Glykolipide inhibierend auf die MG1-Adsorption und CCP (Cystein-Containing-Phosphoprotein) inhibierend auf die Adsorption von MG2 wirken.

Der Lipidanteil der Pellikel dient ebenfalls als selektive Diffusionsbarriere für verschiedene Säuren und Ionen. In einer Studie von Slomiany et al. (1990) wurden die Lipide aus der Pellikel entfernt und dies führte zum Beispiel zu einer Erhöhung der Diffusionsrate von Milchsäure um 50%. Den größten Anteil der Schutzfunktion gegenüber Milchsäurediffusion übernehmen die Glykolipide,

gefolgt von den Phospholipiden und den neutralen Lipiden. Den quantitativ höchsten Effekt haben die Phospholipide (Slomiany et al. 1986).

Eine weitere funktionelle Wirkung hat die Pellikel auf die stattfindende mikrobielle Adhärenz. Die initiale Pellikelschicht verringert beispielsweise die Anheftung von *S. mutans*, *S. salivarius* und *A. naeslundii* an den Schmelz, erhöht jedoch die Bindung von *S. mitis* und *A. viscosus* (Clark et al. 1978). Die bakterielle Biofilmbildung scheint von der initialen bakterienfreien Pellikel determiniert zu sein. Sie fördert die Anheftung harmloserer Bakterien und minimiert somit die Gefahr der Entstehung oraler Erkrankungen (Lendenmann et al. 2000).

Nach Sönju und Rölla (1973) erreicht die Pellikel erst nach 2 h ihre volle Schichtdicke und Lendenmann et al. (2000) postulieren, dass eine frisch gebildete Pellikel in eine ältere, stabilere Pellikel umgewandelt wird, die erst dann in der Lage sein soll, die Zähne gegen Demineralisation zu schützen. Die Pellikel unterliegt einem sogenannten Maturationsprozess, der den protektiven Charakter der Pellikel fördern soll. Die Wirkung enzymatischer Vorgänge in der Pellikel auf den Maturationsprozess wurde in einer Studie von Hannig C. et al. (2008) untersucht. Es zeigt sich ein Einfluss der Transglutaminase- und Phosphataseaktivität. Enzymatische Vernetzungen und Desphosphorylierungsvorgänge innerhalb der Pellikel scheinen eine größere Rolle im Maturationsprozess zu spielen als zum Beispiel proteolytische Reaktionen (Hannig C. et al. 2008). Die Frage nach der erhöhten Schutzfunktion einer älteren Pellikel nach vollzogenem Maturationsprozess ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Ältere Studien von Hannig M. und Balz (1999, 2001) dokumentierten, dass eine über 2 h, 6 h, 12 h, 24 h und 7 Tage in-vivo gebildete Pellikel keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Schutzfunktion gegenüber Zitronensäureerosion besitzt und dass palatinal gebildete Pellikel schneller gelöst werden als bukkal gebildete Pellikel.

Dies lässt darauf schließen, dass die Schichtdicke der Pellikel und die Pellikelzusammensetzung die protektive Eigenschaft determiniert (Amaechi et al. 1999, Hannig M. und Balz 2001). Eine aktuellere Studie von Deimling et al. (2007) beschäftigte sich mit der Darstellung von anti-mikrobiellen Substanzen und Pufferbestandteilen der Pellikel und der Frage nach deren Verteilung in der Pellikel in Abhängigkeit von der Pellikelbildungszeit und der intraoralen Lokalisation. Es zeigt sich in der intraoral bukkal gebildeten Pellikel gegenüber der

palatinal gebildeten Pellikel eine unterschiedliche Verteilung der Lactoferrin- und Lysozymbestandteile, wohingegen die Carboanhydrasen 1 und 2 und das Immunglobulin A (IgA) eine gleichbleibende Verteilung aufweisen unabhängig von der intraoralen Lokalisation der Pellikelbildung. Die in der initialen Pellikel verteilten anti-mikrobiellen Substanzen sowie die Pufferproteine scheinen eine frühe Abwehrbarriere in der Pellikel darzustellen (Deimling et al. 2007).

Bennick et al. (1983) untersuchte die Gesamtmasse der Proteine und der sauren prolinreichen Proteine einer Pellikel. Diese Proteine unterliegen über 24 h innerhalb des Maturationsprozesses der Pellikel primären typischen Veränderungen. Der Prozentsatz der enthaltenen prolinreichen Proteine steigt während der ersten Stunden des Pellikelbildungsprozesses bereits auf 37% des gesamten Proteingehaltes. Beim Vergleich des Gesamtgehaltes an prolinreichen Proteinen einer 1-h-Pellikel und einer 24-h-Pellikel werden nur sehr geringe Unterschiede festgestellt, wohingegen die Analyse einer noch älteren Pellikel eine partielle Degradation an Proteinen aufweist (Bennick et al. 1983).

Die Speichelsekretion der verschiedenen Speicheldrüsen variiert in Qualität und Quantität der Speichelzusammensetzung. Der Parotisspeichel ist reich an Amylase und prolinreichen Proteinen und die Glandula sublingualis sezerniert hohe Konzentrationen von Speichelmuzinen (MG1, MG2) und Lysozymen. Die an verschiedenen Lokalisationen in-vivo gebildete Pellikel ist demnach charakterisiert durch lokal spezifische Zusammensetzung unter anderem beispielsweise bedingt durch die lokal unterschiedliche Zusammensetzung des Speichels, durch die verschieden auftretenden Schichtdicken der Pellikel und durch Unterschiede in ihrer ultrastrukturellen Zusammensetzung (Hannig M. 1997, 1999, Amaechi et al. 1999, Carlen et al. 1998).

2.2.4 Verfahren zur Untersuchung der Pellikel

Zur Untersuchung der initial erworbenen Pellikel werden unterschiedliche Verfahren herangezogen. Die molekulare Zusammensetzung wird mit Hilfe von Aminosäureanalysen, immunologischen Methoden, Gel-Filtrationen, Ionenaustausch-Chromatographie und Elektrophorese analysiert (Siqueira et al. 2007, Vitorino et al. 2008). Mit der Western-Blott-Technik wurde in einer Studie von Vacca-Smith und Bowen (2000) beispielsweise die Pellikelzusammensetzung und die Aktivität einiger enthaltener Enzyme nach

verschiedenen Expositionszeiten intraoral auf Hydroxyapatitdiscs untersucht. Zimehl und Hannig M. (2001) beschäftigten sich mit den stattfindenden Bioadhäsionsprozessen auf der Hydroxylapatit-Oberfläche des Schmelzes, indem sie unter anderem IR-Spektrometrie und X-Ray-Spektrometrie als Untersuchungsverfahren nutzten.

Um strukturelle Besonderheiten, die Morphologie und die Ultrastruktur der Pellikel näher beleuchten zu können, wurden zahlreiche Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop, dem REM (Rasterelektronenmikroskop) und dem TEM (Transmissionselektronenmikroskop) durchgeführt (Hannig M. 1997, 1998, Schüpbach et al. 2001, Vitkov et al. 2004).

Eine Studie von Hannig M. et al. (2005) stellte sich die Frage, inwiefern Verfahren zur Pellikelgewinnung von Schmelzoberflächen erfolgreich sind. TEM-Aufnahmen zeigen, dass nicht alle bisher angewendeten Verfahren die gesamte Pellikel erfassen und dass die Ergebnisse einer Studie zur Pellikelzusammensetzung maßgeblich von dem Pellikelgewinnungsverfahren abhängig sind.

Transmissionselektronenmikroskopische Messungen zeigen hinsichtlich der Ultrastruktur der initialen Pellikel relativ einheitliche Erkenntnisse. Die Pellikel besteht aus einer elektronendichten Basisschicht, die schon nach wenigen Minuten intraoraler Pellikelbildung im TEM sichtbar wird (Hannig M. 1998). Der spätere dünne aufgelagerte Proteinfilm bildet entweder eine globuläre, fibrilläre oder granuläre Schicht (Lie 1977).

Das Vorhandensein dieser globulären, auch als Mizellenartig beschriebenen Strukturen in der Pellikel wird auch von Vitkov et al. (2004), Hannig M. (1997, 1999) und Schüpbach et al. (2001) in REM- und TEM-Analysen bestätigt.

Außerdem sind bei unterschiedlicher Lokalisation der Proben in der Mundhöhle individuell unterschiedlich strukturierte Pellikel sichtbar. Bukkal erworbene Pellikel weisen schon nach 30 min intraoraler Expositionszeit eine heterogen geschichtete, globuläre Anordnung mit lockerem Kontakt zu der elektronendichten Basisschicht mit einer Schichtstärke von bis zu 300 nm auf (Hannig M. 1999). Lingual gebildete Pellikel wachsen langsamer, sind nicht so komplex in ihrer Ultrastruktur und haben nach 60-minütiger intraoraler Expositionszeit nur eine Schichtstärke von 30-50 nm (Hannig M. 1999).

Weitere TEM-Untersuchungen von Hannig M. (1997) zur Pellikelkonfiguration auf unterschiedlichen Materialien stellten fest, dass die initiale adsorbierte Schicht die physiko-chemischen Eigenschaften der Materialien maskiert und dass die weitere Anlagerung der im TEM sichtbaren, locker strukturierten Proteinschicht auf verschiedenen Festkörperoberflächen keine signifikanten Unterschiede zeigt. Die Aufbereitung der Proben zur Untersuchung mit dem REM und TEM ist sehr umfangreich und beinhaltet zum Beispiel eine Dehydratation und Fixation der Pellikel. Bei den TEM-Messungen sind Ultradünnschnitte der fixierten Proben erforderlich und die Gesamtheit der Vorbereitungsprozeduren beinhaltet daher viele präparationsbedingte Artefakte. Vor allem erlauben diese Methoden nicht die Untersuchung der Pellikel in ihrem natürlichen Zustand.

Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen ermöglichen hingegen die Darstellung der Pellikel unter physiologischen Konditionen und die dreidimensionale Darstellung im Nanometerbereich. Von Hannig M. et al. (2004) durchgeführte AFM-Messungen ließen ebenso globuläre Strukturen der Pellikel mit Durchmessern von ca. 15 nm und Höhen von ca. 2 nm erkennen. In einer weiteren Studie wird außerdem in Abhängigkeit von den intraoralen Zeitperioden nachgewiesen, dass die Pellikelstruktur nach 30 min homogener als nach 10 min erscheint und dass nach 30-120 min ein Plateau erreicht wird (Hannig M. et al. 2001).

Weitere angewendete Verfahren sind beispielsweise die Reflektometrie und die Ellipsometrie. Eine Studie von Vassilakos et al. (1993) verglich die beiden Verfahren zur Pellikeluntersuchung und stellte fest, dass auch die Reflektometrie ein angemessenes, recht billiges und schnelles Verfahren darstellt, um Schichtdickenmessungen von initialen Pellikeln durchzuführen.

Ellipsometrische Messungen der Pellikel sind bislang noch selten durchgeführt worden. Die Ellipsometrie ist ein zerstörungsfreies Prüfverfahren. Eine Studie von Ericson et al. (1982) untersuchte mittels der Ellipsometrie die kinetischen Vorgänge während der In-vitro-Biofilmbildung auf Silikon und Schmelz. Die Ergebnisse bestätigen die Zwei-Phasen-Theorie der Pellikelbildung, die auch über Aminosäureanalysen der Pellikel beobachtet wird (Skjörland et al. 1995). Weitere ellipsometrische In-vitro-Studien liegen von Joiner et al. (2003, 2004, 2006) vor. Sie bearbeiten den Einfluss von schwarzem Tee und dessen Inhaltsstoffen, beispielsweise Polyphenole, und von Rotwein und Chlorhexidin auf die Adsorp-

tionsvorgänge der Pellikelbildung und studieren die Widerstandsfähigkeit der resultierenden Pellikel. Auch in einer Studie von Lindh (2002) wird die Ellipsometrie als Verfahren genutzt, um die In-vitro-Adsorption von selektierten Speichelproteinen und menschlichem Speichel auf hydrophoben und hydrophilen Substanzen zu untersuchen.

2.3 Vorstellung verschiedener Analysemethoden

Die analytische Charakterisierung einer Struktur besteht darin, die Geometrie und die funktionalen Eigenschaften mit hoher Präzision quantitativ zu erfassen. Dazu muss die zu untersuchende Struktur mit einer geeigneten Methode untersucht werden. Zur Vermessung und Analyse individueller Nanostrukturen sind Techniken erforderlich, die eine möglichst hohe räumliche Auflösung bieten.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die strukturellen Besonderheiten der Pellikel genauer zu beleuchten und anhand mehrerer Methoden die gefundenen Daten zu vergleichen. Zur Untersuchung der Pellikel wurden das AFM (Rasterkraftmikroskop), das TEM (Transmissionselektronenmikroskop) und das Ellipsometer herangezogen. Im Folgenden werden zunächst die Grundlagen und die Funktionsweise dieser Analyse- und Messmethoden näher beschrieben.

2.3.1 AFM (Rasterkraftmikroskopie)

Die Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM) ist ein hochauflösendes Verfahren. Dieses Rastersondenverfahren basiert auf einer mechanischen Abrasterung der zu untersuchenden Probenoberfläche. Dazu wird eine Sonde durch eine piezoelektrische Positioniereinheit in nahem Abstand über die Probe gerastert, wobei die momentan auftretende Kraft zwischen Sonde und Probe gemessen wird. Als Sonde wird ein Hebelarm (Cantilever) verwendet, an deren freiem Ende eine entweder pyramidenförmige oder konische Spitze (Tip) integriert ist, deren Verrundungsradius in der Größenordnung weniger Nanometer ($<10\text{nm}$) liegt.

Das System sollte auf schwingungsisolierten Tischen mit beispielsweise dämpfenden Druckluftfüßen stehen, um verfälschende Vibrationen zu vermeiden. Ebenso ist es sinnvoll in Schallschutzboxen zu arbeiten, um die Einwirkung akustischer Schallwellen zu verhindern. Das Arbeiten unter Vakuumbedingungen erhöht die Auflösung und vermindert das Risiko von äußeren Einflüssen. Die Piezoelemente liefern Scanbereiche von bis zu $150 \times 150 \mu\text{m}$ Größe und die Scangeschwindigkeit liegt in der Regel zwischen 0,5 und 10 Zeilen pro Sekunde (hin und zurück).

2.3.1.1 Aufbau AFM

Das AFM besteht aus folgenden Bauteilen:

1. Messspitze (Tip)
2. Hebelarm (Cantilever)
3. Piezoelektrischer Scanner
4. Probenplatte
5. Laser
6. Photodetektor
7. Controller

Der Aufbau des Rasterkraftmikroskops, sowie eine SEM-Aufnahme eines Hebelarmes mit Spitze (Tip) sind in folgender Abbildung dargestellt.

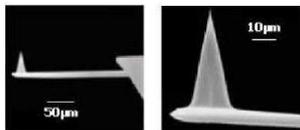
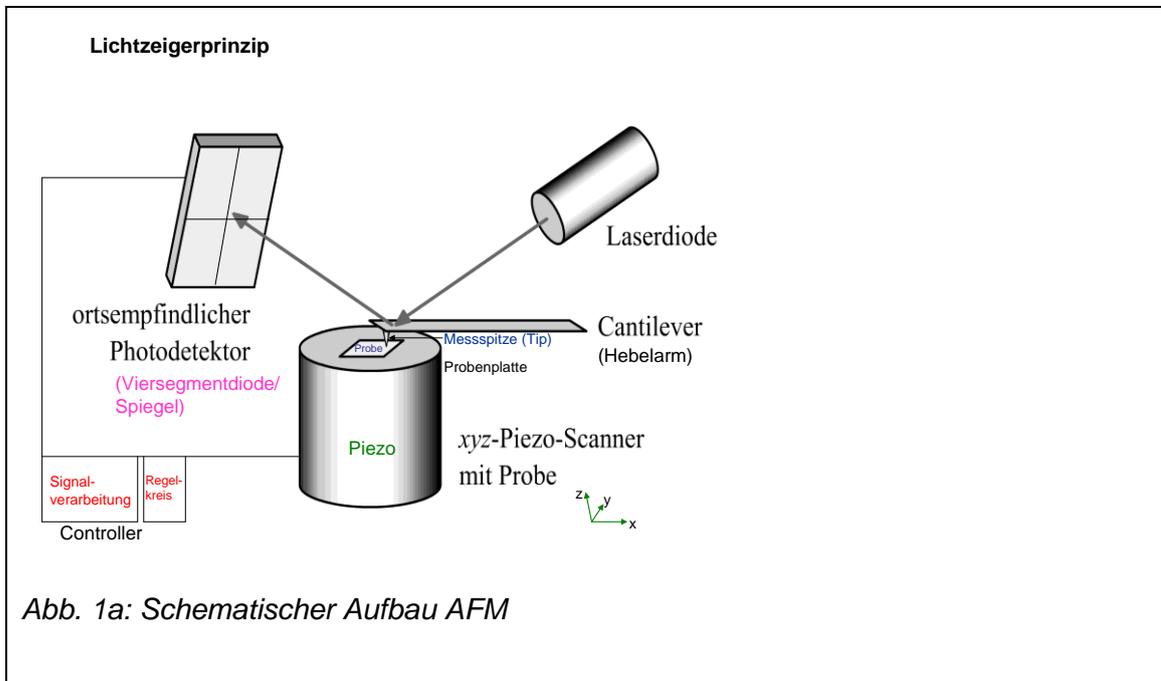


Abb. 1b: Hebelarm und Tip abgebildet im SEM

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines AFM (angepasst nach Scholz, physikalisches Praktikum 2006, 1a) sowie eine SEM-Aufnahme eines Hebelarmes mit Tip (Mironov 2004, 1b).

2.3.1.2 Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops

Wie zuvor erläutert, wird während der Messung eine an einem Biegeelement befindliche oftmals lithographisch hergestellte Messspitze als Sonde mittels eines piezoelektrischen Antriebs zeilenweise in einem definierten Raster über die Probenoberfläche geführt. Bedingt durch die Topografie der Probe kommt es zu einer lokal unterschiedlichen Verbiegung des Hebelarms. Da die Verbiegung des Cantilevers das Messsignal darstellt, muss diese für genaue Untersuchungen möglichst fein detektiert werden. Dabei sollte die Messung die Verbiegung des Cantilevers nicht beeinflussen. Die am häufigsten verwendete Methode der Auslenkungsmessung ist das Lichtzeigerprinzip. Bei dieser Methode wird ein fokussierter Laserstrahl von der Rückseite des Cantilevers auf eine segmentierte Photodiode reflektiert. Der aufgefächerte Lichtstrahl beleuchtet gleichzeitig mehrere Segmente der Vierquadranten-Photodiode. Jeder Quadrant der Diode liefert eine Spannung, welche proportional zur Intensität des Lichts ist. Aus den anteiligen Intensitäten lässt sich lokal die Auslenkung des Cantilevers berechnen (siehe Abbildung 1a).

Auflösung eines Rasterkraftmikroskops:

Ähnlich wie die Wellenlänge des verwendeten Lichtes bei der optischen Mikroskopie die Auflösung begrenzt, so wird die Auflösung bei der Rasterkraftmikroskopie wesentlich von der Feinheit und damit von dem Spitzenradius der verwendeten Spitze bestimmt (siehe Abbildung 1b). Das aus den gemessenen Signalen rekonstruierte Oberflächenprofil ist immer eine Faltung der wirklichen Oberfläche mit dem Aussehen der Spitze. In jedem Fall verbreitert die nicht infinitesimal kleine Spitze alle topografischen Merkmale der Probe. Ebenso können Steigungen der Topografie nur korrekt gemessen werden, wenn diese kleiner als die Anstellwinkel der scannenden Spitzenseite sind. Geometrische Effekte zwischen Spitze und Probe, die das gemessene Signal verfälschen, werden Spitzenartefakte genannt.

2.3.1.3 Betriebsmodi

Der Kontakt-Modus

Befindet sich die Sonde im direkten mechanischen Kontakt (contact-mode) mit der Probe bei hinreichend kleinen Auflagekräften, so kann die Topografie der

Probenoberfläche hochauflösend abgetastet werden. Folgt die Spitze beim Abrastern der Topografie der Probe, überträgt sie Normalkräfte auf den Cantilever und dieser verbiegt sich. Lichtzeiger und Photodiode sind nun so eingerichtet, dass diese Verbiegung die Lichtanteile zwischen den oberen und unteren Segmenten des Photodiodenfeldes verschiebt. Die Differenzspannung dieser beiden Felder wird als Maß für die Auslenkung verwendet. Dreidimensionale Darstellungen der Oberfläche erhält man durch Auftrag der lokalen Probenhöhe gegen die horizontale Position der Spitze.

Grundlegend werden zwei unterschiedliche Scanmodalitäten unterschieden. Im »constant height«-Modus wird die Höhe der Spitze über der Probe im Verlauf der Messung nicht nachgeregelt. Das Differenzsignal der oberen und unteren Photodiodensegmente ist ein Maß für die Topografie der Probe. Da die mechanische Verbiegung des Hebelarms begrenzt ist, kann bei Proben mit großen und abrupten Topografieänderungen der Cantilever abbrechen. Um diesem Vorfall vorzubeugen, kann im so genannten »constant force«-Modus gemessen werden. Hierbei wird die Höhenverstellung des Scanners derart nachgeregelt, dass das Photodiodensignal und somit die Kraft auf die Spitze konstant bleibt. Die Aufzeichnung der Höhennachregelung stellt die Topografie der gescannten Oberfläche dar.

Der kontaktlose Modus:

Das Messprinzip des kontaktlosen Modus (non-contact-mode) beruht darauf, den Cantilever mittels eines geeigneten piezoelektrischen Aktors in eine harmonische Schwingung zu versetzen. Ein Annähern der Sonde an die Probenoberfläche führt zu einer Änderung der effektiven Federkonstanten des Cantilevers, was sich in einer veränderten Schwingungsfrequenz und Phasenlage der Schwingung des Biegeelementes gegenüber dem Anregungssignal äußert. Der Regelkreis hält durch Variation des Sonde-Probe-Abstands diese beiden Verschiebungen konstant. Ein Spezialfall eines kontaktlosen Modus ist der Tapping-Mode oder Intermittent-Contact-Mode. Hierbei berührt die Sondenspitze in ihrem unteren Umkehrpunkt die Probenoberfläche und oszilliert mit einer gestauchten Amplitude. Jede Änderung der Topografie hat eine Modifikation der Amplitude zur Folge. Um die Amplitude konstant zu halten, ändert

der Regelkreis ständig die vertikale Position der Probe, woraus sich ebenfalls die Oberflächentopografie ableiten lässt.

2.3.1.4 Systembedingte Fehler

Es können im Betrieb folgende Fehler auftreten:

1. Vibrationen: Gebäudeschwingungen, Trittschall
2. Thermischer Drift: Thermische Ausdehnung zwischen Probe und Hebelarm
3. Interferenzerscheinungen: Zusätzliche Reflexion des Laserstrahls von der Probe, der mit dem reflektierten Teil der Nadelspitze im Photodetektor interferiert.
4. Statische Aufladungen

2.3.2 TEM (Transmissionselektronenmikroskop)

Prinzipiell arbeitet das TEM nach denselben physikalischen Grundsätzen wie das Lichtmikroskop. Das Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskops ist durch das gewählte Objektiv und durch die Wellenlänge des verwendeten Lichtes gegeben. Möchte man eine höhere Auflösung als in einem Lichtmikroskop erreichen, so muss man die Wellenlänge λ der verwendeten Strahlung verkleinern. Die Strahlung von elementaren Teilchen wie zum Beispiel Elektronen besitzt eine erheblich kürzere Wellenlänge als Licht und man erzielt dadurch Auflösungen im atomaren Bereich. Die Transmissionselektronenmikroskopie ermöglicht eine direkte Abbildung eines Objektes (Morphologie) mit Hilfe von Elektronenstrahlen, die das Probenmaterial transmittieren. Im Gegensatz zu Lichtmikroskopen ist es mit einem Transmissionselektronenmikroskop möglich, von den durchstrahlten Probenbereichen neben vergrößerten Abbildungen auch Beugungsbilder zu erhalten. Dabei gelten, wie für Röntgenstrahlen auch, für freie Elektronen aufgrund ihrer Welleneigenschaften die Laue-Gleichungen und die durch die Struktur des beugenden Gitters bedingten Auslöschungsgesetze. Wegen der starken Wechselwirkung der Elektronen mit der durchstrahlten Materie können selbst mit hochenergetischen Elektronen nur Probenschichten im Bereich von etwa 0,1 μm durchstrahlt werden.

2.3.2.1 Aufbau TEM

Das TEM besteht aus folgenden Bauteilen:

1. Elektronenquelle: Wolframdraht oder Lanthanborid-Kristall. Bei Erhitzung emittiert der Draht Elektronen (Glühkathode).
2. Beschleuniger: Zwischen Anode und Kathode liegt eine Hochspannung (von wenigen kV bis zu 3 MV).
3. Kondensator 1 (magnetische oder elektrostatische Linse)
4. Kondensator 2 (magnetische oder elektrostatische Linse). Die Kondensoren lenken die Flugbahn der Elektronen.
5. Probenhalterung: Stabile Lage, verstellbar
6. Objektiv
7. Projektiv
8. Detektor (CCD-Sensor)

In Abbildung 2 sind Aufbau und Strahlengang eines Transmissionselektronenmikroskops schematisch dargestellt. Das ganze System befindet sich im Vakuum, um Kollisionen der Elektronen mit beispielsweise Gasmolekülen oder Schwebeteilchen zu verhindern.

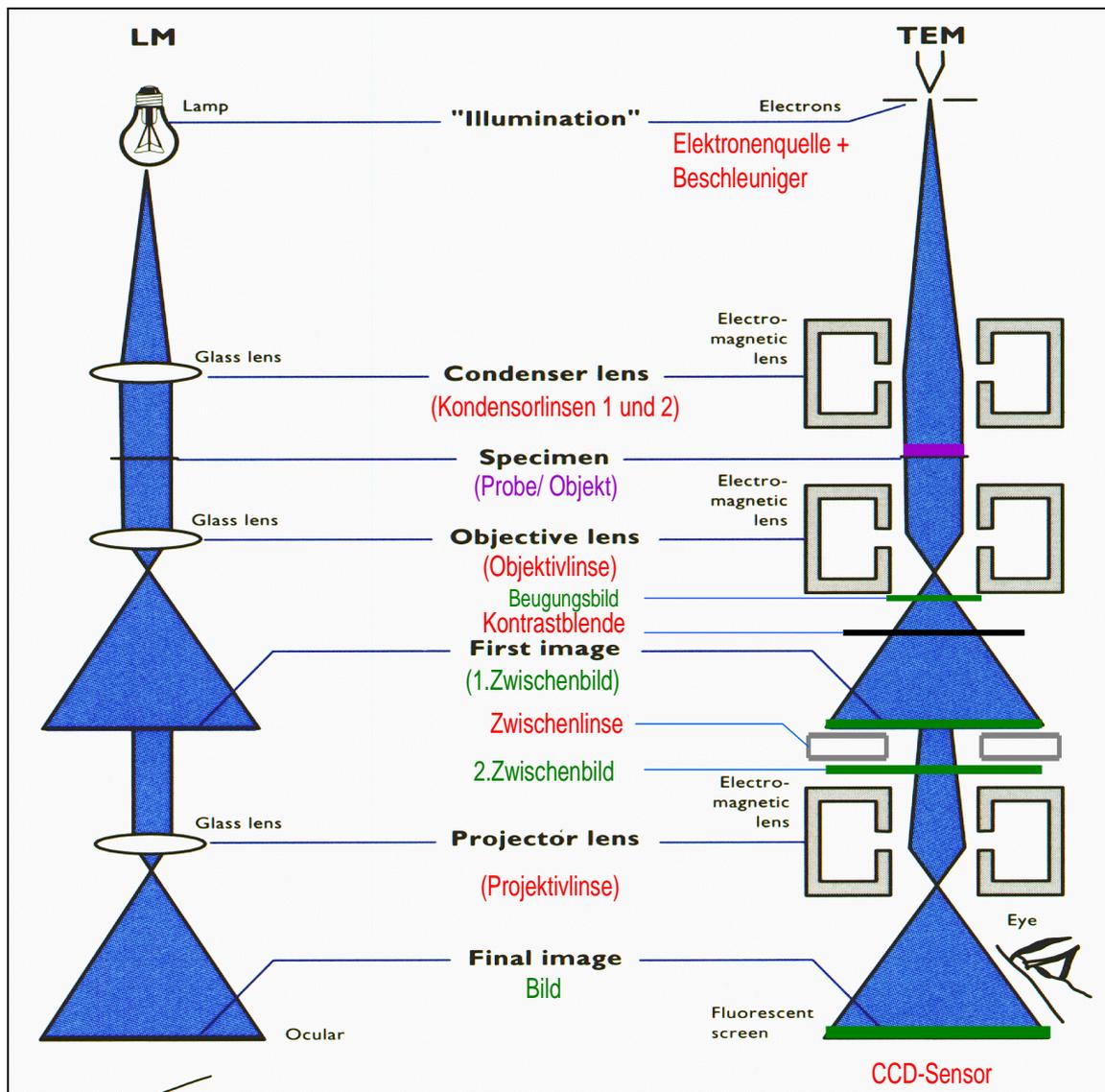


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines TEM im Vergleich zu einem Lichtmikroskop (angepasst nach Mieke et al. 2000).

2.3.2.2 Funktionsweise des Transmissionselektronenmikroskops:

Der Abbildungsstrahlengang des Transmissionselektronenmikroskops ist dem des Lichtmikroskops im Prinzip analog, wobei anstelle von Glaslinsen magnetische Linsen eingesetzt werden. In der Elektronenquelle werden Elektronen durch thermische Emission oder durch Feldemission emittiert und beschleunigt.

Das Kondensorensystem ermöglicht die Monochromatisierung des Elektronenstrahls und Regelung des Strahldurchmessers. Die einfallende Strahlung wird im Objekt entsprechend der Struktur des Probenkörpers modifiziert. Hat der Elektronenstrahl das zu untersuchende Objekt durchdrungen, folgen die Objektivlinsen und die Kontrastblende. Sie entscheidet, ob der Primärstrahl (Hellfeld) oder der gebeugte Strahl (Dunkelfeld) durchgelassen wird. Bei der Hellfeldabbildung werden die abgebeugten Elektronen von der in der Ebene des Beugungsbildes angeordneten Kontrastblende abgefangen, indem die Objektivblende auf den ungebeugten Strahl zentriert ist. Dabei erscheinen stark beugende Probendetails dunkel und schwach beugende hell. Bei der Dunkelfeldabbildung erzeugt ein abgebeugter Strahl das Bild, indem er die Objektivblende passiert, wogegen der Primärstrahl ausgeblendet wird. Dabei erscheinen nur die Bereiche der Probe hell, die Elektronen in diesen Strahl beugen. Die Elektronen, die von einem Objektpunkt in verschiedene Richtungen ausgehen, werden durch die Objektivlinse in der Zwischenbildebene zu einem Bildpunkt vereinigt; die Gesamtheit der von allen Objektpunkten erzeugten Bildpunkte ergibt das Bild des Objekts. Dieses Zwischenbild wird durch die nachfolgenden Linsen (Zwischenlinse, Projektivlinse) stark vergrößert auf dem Leuchtschirm abgebildet.

Auflösung eines Transmissionselektronenmikroskops:

Die Auflösung der Bilder ist abhängig von der Ordnungszahl der Atome aus denen das Objekt besteht, der Höhe der Beschleunigungsspannung für die emittierten Elektronen und der Objektstärke. Bei der Betrachtung biologischer Materialien liegt die typische Beschleunigungsspannung bei 80-120 kV. Atome höherer Ordnungszahl sowie dickere Probenbereiche streuen stärker.

2.3.2.3 Betriebsmodi

Das Mikroskop kann entweder im Abbildungs- oder im Beugungsmodus betrieben werden. Im Abbildungsmodus wird die Zwischenbildebene durch das nachfolgende Linsensystem (Beugungslinse, Zwischenlinse, Projektivlinse) auf dem Leuchtschirm abgebildet. Beim Umschalten in den Beugungsmodus wird die Erregung der Beugungslinse so verändert, dass die hintere Brennebene des Objektivs und somit das Beugungsbild auf dem Leuchtschirm abgebildet wird.

2.3.2.4 Systembedingte Fehler:

Es können im Betrieb folgende Fehler auftreten:

1. Unsachgemäße Fixierung biologischer Proben, präparationsbedingte Artefakte in den Proben
2. Ungewollte Ablenkung, Kollision der Elektronen (Fremdatome)
3. Schädigung der Proben durch den Elektronenstrahl (Erwärmung, Wegstoßen ganzer Atome)

2.3.3 Ellipsometrie

Die Ellipsometrie ist ein phasenempfindliches Reflexionsmessverfahren mit polarisiertem Licht an einer Grenzfläche. Es zählt zu den zerstörungsfreien Messverfahren der Materialforschung und der Oberflächenphysik. Berührungsfreie Messungen können auf einer Fläche von ca. 500x500 μm durchgeführt werden. Mit diesem Verfahren können der Brechungsindex und die Schichtdicke dünner Schichten (bis zu einer Größenordnung von 1 nm) bestimmt werden. Die Messung und Auswertung und die Analyse der ellipsometrischen Daten verläuft rechnergestützt und erfordert das Erstellen eines optischen Modells.

2.3.3.1 Aufbau Ellipsometer

Das Ellipsometer in der so genannten PCSA-Konfiguration besteht aus folgenden Bestandteilen:

1. Lichtquelle (Laser, Bogenlampen)
2. Polarisator P
3. Kompensator C (Retarder)
4. Probenstück (Sample S)
5. Analysator A
6. Detektor
7. Motorisiertes Goniometer (zur Einstellung der Einfallswinkel)
8. CCD-Kamera

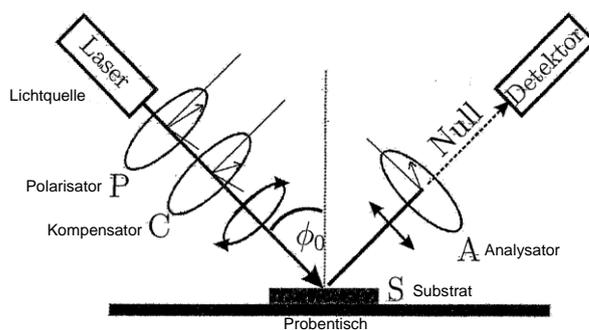


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Ellipsometers (angepasst nach Uni Bayreuth 2004).

Um Erschütterungen beim Messen zu vermeiden, steht das Ellipsometer auf einer stabilen Unterlage. Der schematische Aufbau eines Ellipsometers ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Lichtquelle ist entweder ein Laser oder eine Bogenlampe. Der Polarisator ist ein optisches Element und erzeugt aus Licht mit beliebigem Polarisationszustand einen linear polarisierten Lichtstrahl. Der Kompensator ist ein anisotropes optisches Element und erzeugt aus dem linear polarisierten Lichtstrahl zirkular polarisiertes Licht. Der Analysator bestimmt den Polarisationszustand des Lichtes nach der Reflexion an der Probe. Der Detektor misst die Intensität des Lichts. Es wird das zeitliche Mittel des elektrischen Feldes (Feldstärken) gemessen (siehe Abbildung 5), also die Intensität des gestreuten Lichtes. Die Intensität ist proportional zur Energie des Lichts. Es werden letztlich Intensitätsverhältnisse gemessen, so dass das Anfertigen von Referenzproben bei der Ellipsometrie überflüssig ist. Das motorisierte Goniometer ermöglicht das Vermessen der Probe aus verschiedenen Einfallswinkeln.

2.3.3.2 Funktionsweise:

Das Prinzip der Ellipsometrie beruht auf der Änderung des Polarisationszustandes von Licht bei Reflexion oder Transmission an einer Probe (siehe Abbildung 4).

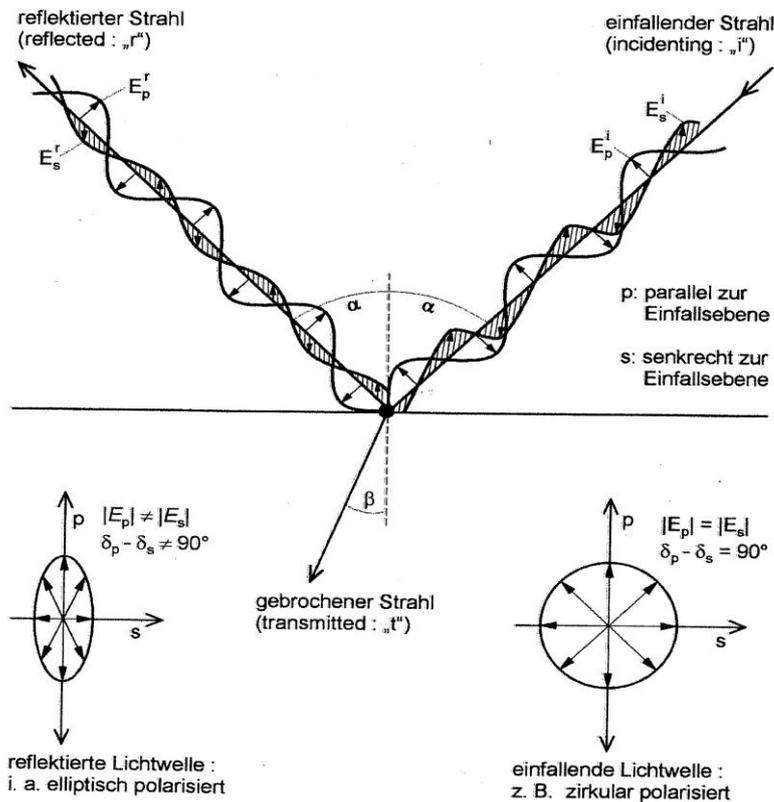


Abbildung 4: Ellipsometrisches Messprinzip: phasenempfindliches Reflexionsexperiment mit polarisiertem Licht. Messung der Änderung des Polarisationszustandes des Lichts (Beck 2000).

Die Änderung des Polarisationszustandes des Lichts durch eine absorbierte Schicht hängt unter anderem auch von deren Schichtdicke ab. Die Ellipsometrie kann vor allem zur genauen Bestimmung von Schichtdicken im Nanometerbereich genutzt werden. Generell wird linear oder zirkular polarisiertes Licht verwendet. Licht als elektromagnetische Welle kann als Überlagerung zweier orthogonal zueinander stehender Wellen dargestellt werden, mit einer parallelen (p) und einer senkrechten (s) Komponente zur Einfallsebene (siehe Abbildung 4). Bei Reflexion an einer Grenzfläche verhalten sich p- und s-Komponenten nach den Fresnel-Formeln unterschiedlich.

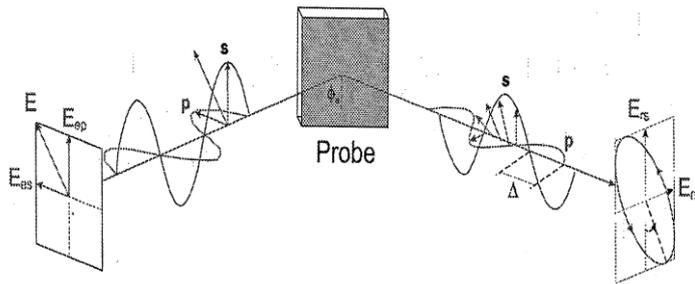


Abbildung 5: Grundlegendes Messprinzip: Die Feldkomponenten definieren die ellipsometrische Grundgleichung (Mantz 2008, angepasst nach Fujiwara 2007).

Trifft ein Laserstrahl unter einem bestimmten Winkel auf die Probe, so wird er an den Grenzflächen Luft, Film und Film, Substrat gebrochen und reflektiert. Es gelten die Fresnel-Gleichungen, die das Verhalten von polarisiertem Licht an Grenzflächen beschreiben. Man erhält für p-polarisiertes Licht und s-polarisiertes Licht einen komplexen Fresnelschen Reflexionskoeffizienten r_s und r_p , der sich aus den einzelnen Reflexionskoeffizienten für die unterschiedlichen Grenzflächen zusammensetzt. Der Quotient der beiden Reflexionskoeffizienten stellt als zu Grunde liegende Messgröße das so genannte ellipsometrische Verhältnis ρ dar. Man erhält die ellipsometrische Grundgleichung:

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \left(\frac{E_{rp}}{E_{ep}} \right) / \left(\frac{E_{rs}}{E_{es}} \right)$$

Oder in komplexer Polarform beschrieben : $\rho = \tan \psi \exp(i\Delta)$

Diese komplexe Größe ρ wird durch die Angaben der beiden ellipsometrischen Winkel ψ und Δ parametrisiert und diese sind die experimentell zugänglichen Daten einer Ellipsometriemessung. Die ellipsometrischen Winkel hängen von dem vorgegebenen Einfallswinkel des Elektronenstrahles, der verwendeten Wellenlänge und auch von den komplexen Brechungsindizes der beteiligten Materialien ab. Da einem Schichtsystem die ellipsometrischen Parameter zuzuordnen sind, kann auch umgekehrt aus den gemessenen Werten von Δ und Ψ indirekt auf Eigenschaften des Schichtsystems geschlossen werden. Dazu wird ein Modell erstellt, das die Abfolge der einzelnen Schichten der Probe, deren optische Konstanten und Schichtdicken enthält. Sind diese Parameter nicht bekannt oder sogar gesucht, werden sie durch eine parametrisierte Funktion be-

schrieben. Durch Variation der Parameter werden die vorgegebenen Modellkurven den experimentellen Kurven angepasst. Mit den gemessenen ellipsometrischen Winkeln können dann mehrere Kombinationen von Brechungszahl (n) und Schichtdicke (d) korrespondieren (siehe Kapitel 3.2.4). Bei der Auswertung muss man daher Grenzen für n und d vorgeben, die der betrachteten Probe, Film entsprechen, so dass letztlich exakte Ergebnisse für den gesuchten Wert erzielt werden können.

2.3.3.3 Betriebsmodi

Es gibt verschiedene Anwendungsmodi des Ellipsometers. Die Null-Ellipsometrie (NE), die Phasen-Modulations-Ellipsometrie (PME) und die Ellipsometrie mit rotierenden Komponenten.

Die Null-Ellipsometrie basiert auf der Auslöschung des Signals im Detektor. Dabei werden die Winkel von P, C und A so eingestellt, dass die Intensität des reflektierten Lichts im Detektor verschwindet, also gleich Null ist. Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass linear polarisiertes Licht in der Regel nach der Reflexion elliptisch polarisiert ist. Der Kompensator C wird dann so eingestellt, dass das Licht nach dem Durchgang nochmals linear polarisiert ist und mit einem senkrecht dazu stehenden Filter ausgelöscht werden kann.

Bei der Phasen-Modulations-Ellipsometrie (PME) ist der Kompensator C in dem Verfahren als Modulator ausgeführt und bei der Ellipsometrie mit rotierenden Komponenten rotiert entweder der Polarisator oder der Analysator.

2.3.3.4 Systembedingte Fehler:

Es können im Betrieb folgende Fehler auftreten:

1. Indirekte Methode
2. Die Bestimmung interessierender physikalischer Größen erfordert eine Modellierung.
3. Streu- und Depolarisationsphänomene in der Probe (Rauheiten)
4. Geringste Verunreinigungen führen zu verfälschten Ergebnissen.

Hinweis: Die Messmethoden sind von Mantz (2008) ausführlicher und aus physikalischer Sicht dargestellt.

2.4 Zielsetzung

Diese In-vivo-Studie widmet sich drei verschiedenen Bereichen. Im ersten Teil wird die mikromorphologische Struktur des initialen Biofilms mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) erforscht und die Ergebnisse in schon vorhandene Erkenntnisse eingeordnet. Die ellipsometrische Untersuchung der Pellikel auf verschiedenen Substraten ist das Thema des zweiten Teiles. Im dritten Teil werden die Ergebnisse der strukturellen Analyse der initialen Pellikel mit den verschiedenen Messmethoden TEM, AFM und Ellipsometrie verglichen und gegenübergestellt.

Teil 1: AFM-Studie zur Pellikelmorphologie

- Gibt es Unterschiede in der Oberflächenmorphologie der Pellikel auf Platin-Araldit- und Siliziumoxid-Wafer-Proben?
- Gibt es Unterschiede in der Oberflächenmorphologie der Pellikel abhängig von den unterschiedlichen intraoralen Expositionszeiten?
- Gibt es Unterschiede zwischen den Probanden im Hinblick auf die Pellikelbildung?
- Gibt es Unterschiede in der Oberflächenmorphologie der Pellikel abhängig von den unterschiedlichen intraoralen Lokalisationen?

Teil 2: Ellipsometrische Analyse der Pellikelbildung auf verschiedenen Substraten

- Gibt es einen Einfluss des Substrates auf die Pellikeldicke?

Teil 3: Methodenvergleich AFM, Ellipsometrie, TEM

- Stimmen die Ergebnisse der drei Messmethoden überein?
- Welche Unterschiede gibt es zwischen den Methoden?
- Wo liegen Schwierigkeiten und Artefaktquellen?
- Genügt die Auswertung mittels einer Messmethode?

3 MATERIAL UND METHODEN

Das Studiendesign untergliederte sich in drei Bereiche. Der erste Teil der Studie beschäftigte sich mit der Pellikeladsorption auf den Substraten Pt-Araldit und Siliziumoxid-Wafer nach drei unterschiedlichen intraoralen Expositionszeiten. Die Proben wurden mittels Rasterkraftmikroskopie im Hinblick auf die Pellikelmorphologie untersucht. Der zweite Teil behandelte den Substratvergleich von Pt-Araldit und einer OTS-beschichteten Siliziumoxid-Wafer-Probe. Die adsorbierte Menge an Pellikel auf den unterschiedlichen Substraten wurde mittels der Ellipsometrie ermittelt. Der dritte Teil dieser Studie beinhaltete die Untersuchung der Biofilmadsorption auf Pt-Araldit-Proben nach 30-minütiger intraoraler Expositionszeit. Es wurden Analysen der Pellikel mit den verschiedenen Methoden AFM, Ellipsometrie und TEM durchgeführt und miteinander verglichen.

3.1 AFM-Studie zur Pellikelmorphologie

3.1.1 Substratbeschreibung und Herstellung der Proben

3.1.1.1 Silizium-Wafer :

Die Proben wurden aus atomar glatten industriell vorgefertigten Siliziumoxidplatten mit 2 nm Siliziumoxid-Oberfläche (natural: Wacker Silctronic AG, Burghausen, Germany) in Proben der Größe 5x5 mm² geschnitten. Die Proben wurden kurz vor Aufnahme der Pellikel in frischem Ethanol (Roth, Karlsruhe, Germany) und Aceton (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany) im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex, Berlin, Germany) gereinigt und mit einem Luftstrom (N₂, Messer Griesheim GmbH, Sulzbach, Germany) getrocknet.

3.1.1.2 Platin-Araldit-Proben :

Basis zur Herstellung der Araldit-Proben war eine industriell gefertigte hochpolierte Siliziumoxidplatte. Sie verminderte die Oberflächenrauheit der resultierenden Aralditplatte. Diese wurde mit Millipore-Wasser (Milli-Q Synthesis, Millipore, Massachusetts, USA) gereinigt. Die Platte wurde am Rand mit Silaplast

(Heraeus Kulzer, Hanau, Germany) abgedämmt. Das Araldit-Gemisch bestand aus Araldit (Cy 212, Serva, Heidelberg, Germany, 13824, 91 Teile), DDSA (2 Dodeceny succinic-acid-anhydride, Serva, Heidelberg, Germany, 20755, 84 Teile) und der Beschleuniger aus 2, 4, 6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (Serva, Heidelberg, Germany, 36975). Das Araldit-Gemisch wurde mit 2% Beschleuniger angerührt und vorsichtig ohne Blasenbildung auf die Siliziumplatte gegossen. Das Araldit-Gemisch wurde bei 65°C im Wärmeschrank (WTE binder, Tuttlingen, Germany) über 48 h polymerisiert. Das auspolymerisierte Araldit wurde vorsichtig von dem Silizium-Wafer getrennt. Die Oberfläche der Aralditplatte war die dem Silizium-Wafer zugewandte Seite. Die Unterseite wurde mit der Schleifmaschine (Metkon Gripo 2V, Burbach, Germany) und Schleifpapier (Grit 400, 800 SiC; Buehler, Düsseldorf, Germany) auf 2 mm Schichtdicke reduziert und die Aralditplatte wurde dann in 24 Prüfkörper zersägt.

Die Proben wurden in drei Arbeitsschritten gesäubert. Zunächst im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex, Berlin, Germany) in Hypochlorit (1-2 min), dann in Ethanol (1 min) und letztlich wurden sie mit Millipore-Wasser abgesprüht. Anschließend wurden die Proben mit einem Luftstrahl getrocknet. Die sauberen, gesägten Proben wurden zwei Mal 2 min lang mit Platin besputtert und erhielten ihre definitive Oberfläche zur Aufnahme der oralen Pellikel. Kurz vor der intraoralen Aufnahme der Proben zur Pellikelbildung wurden diese in frischem Ethanol und Aceton im Ultraschallbad gereinigt und mit einem Luftstrom getrocknet.

3.1.2 Die In-situ-Pellikelbildung

Das probandenbasierte Studiendesign wurde durch das Votum der Ethik-Kommission AZ 238, 03 der Ärztekammer des Saarlandes begutachtet und positiv beschieden.

Es wurden in dieser Teilstudie vier Erwachsene, drei Frauen und ein Mann, mit guter Mundhygiene involviert (24-35 Jahre).

Der Proband hatte am Tag der Probennahme morgens die Zähne mit Zahnbürste und Zahnpasta geputzt, gefrühstückt, danach erneut ohne Zahnpasta geputzt und den Mund mit Wasser ausgespült. Danach nahm der Proband keinerlei Nahrung oder Getränke mehr zu sich. Die Proben wurden an einer individuell für den Probanden gefertigten Minioplastschiene mit dem A-Silikon „Flexitime-Correct Flow“ (Heraeus Kulzer, Hanau, Germany) an vier verschie-

denen Lokalisationen, an Zahn 16 bukkal und palatinal (16b, 16p) und an Zahn 26 bukkal und palatinal (26b, 26p) (siehe Abbildung 6) nacheinander ohne Kontamination der Probenoberfläche an der Schiene befestigt.

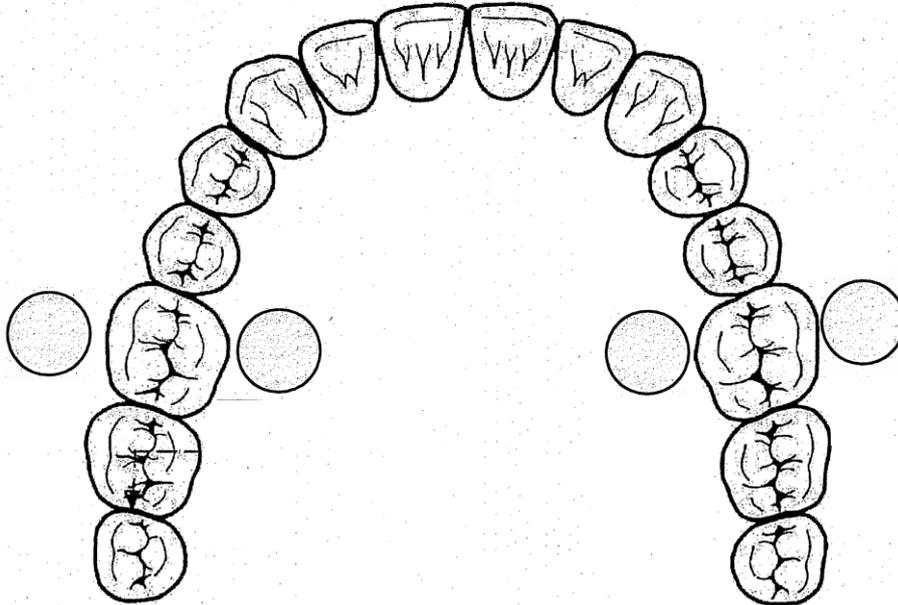


Abbildung 6: Schematische Anordnung der Prüfkörper (Zahnbogen angepasst nach Lehmann und Hellwig 1998).

Die Minioplastschiene wurde von jedem Probanden zu drei verschiedenen Zeiteinheiten getragen (3 min, 30 min und 120 min). Während des Tragens nahmen die Probanden ebenfalls keinerlei Nahrung oder Getränke zu sich. Nach Entnahme der Minioplastschiene aus dem Mund wurden die Proben mit den gewonnenen Pellikeln vorsichtig mit Millipore-Wasser abgespült. Es wurde vermieden, den Wasserstrahl direkt auf die Proben zu halten. Im Anschluß erfolgte die Fixation der Pellikel.

3.1.3 Fixierung und Vorbereitung zur AFM-Messung

Die Arbeit mit biologischem Material erforderte präparative Maßnahmen, um den Verlust der Pellikelschicht zu verhindern. Die Pellikel wurden chemisch fixiert. Die Fixierlösung bestand aus 100 ml Glutaraldehyd 25% (Serva, Heidelberg, Germany, 23114), 40 ml Formaldehyd 37% (Merck, Darmstadt, Germany, 104003) und wurde mit Phosphatpuffer nach Sörensen auf pH 7,4 auf 1000 ml eingestellt. Zunächst wurden alle Proben in einer Fixierlösung für 40 min in ei-

ner kleinen Glasflasche gelagert. Bei dieser Fixation wurden hauptsächlich Proteine vernetzt. Durch die Quervernetzung wurden zelluläre Strukturen stabilisiert und eine Dislokation oder Aggregation von Makromolekülen während des weiteren Arbeitens vermieden.

Nach 40 min wurde die Lösung unter einem Abzug abpipettiert und danach die Phosphatpufferlösung in die Lösung hineinpipettiert. Die Proben wurden fünf Mal 10 min lang mit Phosphatpuffer gespült. Der Phosphatpuffer bestand aus 120 mg Natriumdihydrogenphosphat (wasserfrei), 100 ml Millipore-Wasser, 890 mg Natriumhydrogenphosphat und 500 ml Millipore-Wasser. Die Flüssigkeiten wurden gemischt, bis sich der entsprechende pH-Wert eingestellt hatte. Nach diesem Verfahren wurden die Proben vorsichtig mit einem Luftstrom getrocknet und in kleinen Probenbehältern gelagert.

3.1.4 Beschreibung der AFM-Messung

Die AFM-Aufnahmen erfolgten mit dem AFM-Gerät vom Typ Dimension 3100 (Digital Instruments, Veeco, Mannheim, Germany) und wurden alle im „Tapping-Mode“ aufgenommen. Die verwendeten Spitzen (Tip) waren von „Olympus OMCL-AC 160 TS“ (Atomic Force F&E GmbH, Mannheim, Germany) mit einem Spitzenradius von $R < 10 \text{ nm}$.

Die Auflösungsqualität des AFM war abhängig von dem Spitzenradius (R) des verwendeten Tips (siehe Abbildung 7). Die abgebildeten Durchmesser (d) der Proteinpartikel erschienen daher bildlich zu groß.

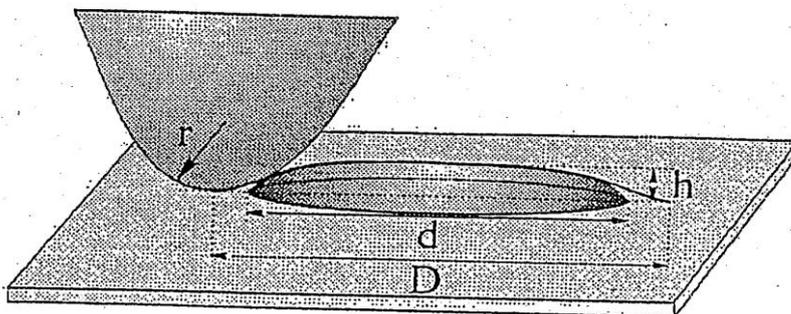


Abbildung 7: Darstellung der Relation zwischen Tip und Probenoberfläche (Hannig M. et al. 2004).

Bei $R > d/2$ wurden die abgelesenen Durchmesser mit der folgenden Formel berechnet: $D = 2 \times ((R + d/4)^{0,5})$.

Bei $R < d/2$ wurden die Durchmesser als $D = d - 2R$ angenommen.

In dieser Studie konnte man mit einem angenommenen Spitzenradius von maximal $R = 10 \text{ nm}$ vereinfacht die folgende Formel zur Berechnung verwenden:

Bei $d > 20 \text{ nm}$: $D = d - 20 \text{ nm}$

Die berechneten Werte wurden im Mittel bei $0,5 \text{ nm}$ beziehungsweise aufgerundet.

Mit dem AFM wurde die Oberflächenmorphologie analysiert und Höhenmessungen durchgeführt.

Die eingestellte Resonanzfrequenz lag bei 365 kHz und die Federkonstante bei ca. 70 N/m .

Es wurden Bilder unterschiedlicher Auflösung in den Größenordnungen $200 \times 200 \text{ nm}$, $500 \times 500 \text{ nm}$, $1 \times 1 \text{ }\mu\text{m}$ und $5 \times 5 \text{ }\mu\text{m}$ mit einer Scan-Geschwindigkeit von $0,5 \text{ Hz}$ und 512×512 Bildpunkten pro Bild angefertigt.

3.2 Ellipsometrische Analyse der Pellikelbildung auf verschiedenen Substraten

3.2.1 Substratbeschreibung und Herstellung der Proben

3.2.1.1 Siliziumoxid-Wafer

Die Prüfkörper aus Siliziumoxid-Wafer wurden hergestellt wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben.

3.2.1.2 OTS (Oktadecyltrichlorsilan):

Das Silanisierungsverfahren geht auf ein von Jacobs (1997) eingeführtes Standardverfahren zurück, das von Sagiv (1980) und Brzoska et al. (1994) vorgeschlagen wurde.

Die Basis der Probe bildete ein Siliziumoxid-Wafer, der silanisiert und somit hydrophobisiert wurde. Der gereinigte Wafer wurde dabei wiederholt in eine aus 50 ml Bicyclohexan, 30 Tropfen Tetrachlorkohlenstoff und 13 Tropfen Octadecyltrichlorsilan(OTS) bestehende Lösung gelegt. Dabei bildete sich eine homogene, selbstorganisierte Monolage aus den OTS-Kohlenstoffketten aus. Vor der Verwendung wurden die OTS-beschichteten Substrate für jeweils 10 min in frischem Ethanol (Roth, Karlsruhe, Germany), Aceton (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany) und Toluol (Merck, Darmstadt, Germany) im Ultraschallbad gereinigt und dazwischen gründlich mit N₂ trocken geblasen (Mantz 2008).

3.2.2 Die In-situ-Pellikelbildung

Die In-situ-Pellikelbildung erfolgte wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben und es standen dieselben Probanden zur Verfügung. Die Substrate wurden jedoch nur an den Zähnen 16 und 26 bukkal platziert.

3.2.3 Fixierung und Vorbereitung zur ellipsometrischen Messung

Die Fixierung erfolgte ebenso nach den Standardverfahren wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben.

3.2.4 Beschreibung der Messung mit dem Ellipsometer

Die Messungen wurden mit dem Ellipsometer vom Typ Nanofilm EP³ (Nanofilm Surface Analysis, Göttingen, Germany) durchgeführt, das nach dem Null-Prinzip in PCSA-Anordnung arbeitete. Die Anordnung befand sich auf einem schwingungs isolierten Tisch (aktiv gesteuerter Tisch, Halcyonics, Göttingen), der wiederum auf einem Marmortisch stand.

Es wurden von den Materialproben Referenzmessungen angefertigt, um Strukturen, die sich nach der Pellikelbildung an der Oberfläche gebildet hatten, von der Substratrauheit zu unterscheiden und um die optischen Eigenschaften ohne adsorbierte Schicht zu bestimmen.

Für die Platin-Aralditproben wurde eine ellipsometrische Charakterisierung vorgenommen, das heißt, es wurde ein optisches Modell entwickelt, so dass darauf aufbauend die Messwerte für die Einfallswinkel hier zwischen 70° und 80° simuliert werden konnten, wenn sich zusätzlich ein Pellikelfilm der Dicke d auf der Probe befand.

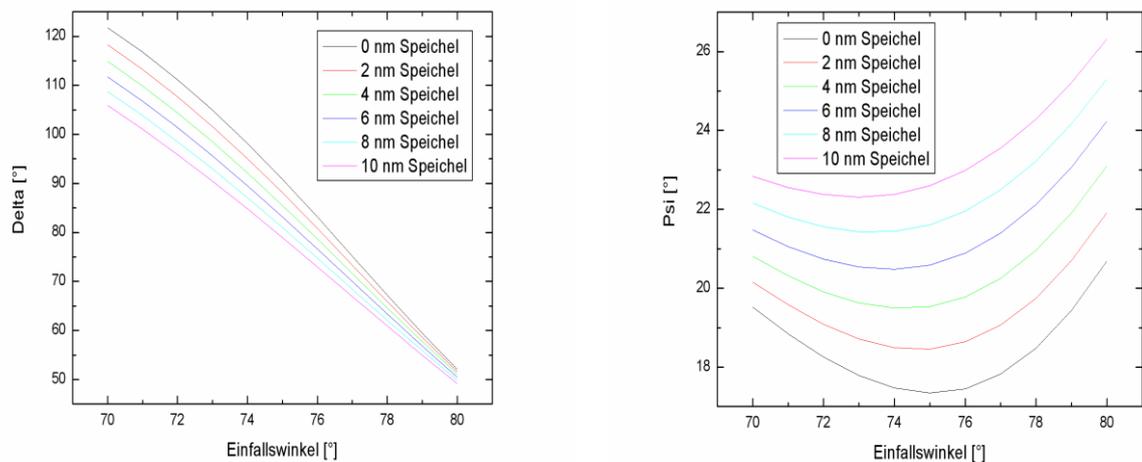


Abbildung 8: Simulation der ellipsometrischen Winkel bei Adsorption einer Speichelschicht unterschiedlicher Dicke (Mantz 2008).

Die pellikelbehafteten Proben wurden alle drei Mal an unterschiedlichen Punkten mit einer Wellenlänge von $\lambda = 531,6$ nm gemessen und jede einzelne Messung bestand aus einem gemittelten Wert aus 6 Messungen mit den unterschiedlichen Einfallswinkeln von 70° - bis 80° Grad in Schritten von 2° Grad aufwärts.

Die gemessene Dicke d des Speichofilms war dabei nicht unbedingt eine reale Dicke, da sie unter Annahme eines festen Brechungsindex (hier $n_{\text{Speichel}} = 1,5$) ermittelt wurde.

Die Simulation der erwarteten Messwerte für die Einfallswinkel zwischen 70° - und 80° Grad war sinnvoll, da sich hier bereits bei kleinen Schichtdicken die beiden ellipsometrischen Winkel deutlich verschoben hatten und die ermittelten Messergebnisse dadurch exakter wurden (siehe Abbildung 8).

Das physikalisch genaue Messprinzip der Null-Ellipsometrie, sowie die physikalisch erforderlichen Berechnungen und das Erstellen der optischen Modelle wurden von Mantz (2008) durchgeführt und in seiner Dissertation ausführlich beschrieben.

3.3 Methodenvergleich AFM, Ellipsometer und TEM

3.3.1 Substratbeschreibung und Herstellung der Proben

Die Araldit-Proben wurden hergestellt wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben.

3.3.2 Die In-situ-Pellikelbildung

In dieser Studie standen zwei weibliche Probandinnen mit guter Mundhygiene zur Verfügung. Die Pellikelbildung wurde, wie in Abschnitt 3.1.2 bereits beschrieben, durchgeführt. Die Proben wurden jedoch nur an den Zähnen 16 und 26 bukkal platziert.

3.3.3 Fixierung und Vorbereitung zur Messung

Die Proben wurden, wie in Abschnitt 3.1.3 bereits beschrieben, fixiert.

Als Vorbereitung zur Messung mit dem TEM mussten diese Proben mittels einer Osmierung nachfixiert und in Araldit eingebettet werden. Die Proben lagerten für 2 h in Osmiumsäure-Lösung. Die Osmiumsäure-Lösung bestand aus einer 2% OsO_4 -Lösung in Phosphatpuffer (pH 7,4). Danach wurde die Säure aus den Glasfläschchen abpipettiert und die Pufferlösung hineinpipettiert. Der Vorgang wurde alle 10 min fünf Mal wiederholt. Nach der Osmierung folgte die Entwässerungsphase. Die Proben wurden in Alkohol aufsteigender Konzentration dehydriert.

- 2 x 20 min in 50% Alkohol
- 2 x 20 min in 70% Alkohol
- 2 x 20 min in 90% Alkohol
- 1 x 10 min in 100% Alkohol
- 2 x 20 min in 100% Alkohol
- 2 x 20 min in Epoxypropan (Propylenoxid, Serva, Heidelberg, Germany)

Es folgte die Einbettung der Proben in Araldit. Bei der Einbettung infiltrierte das Kunstharz in die Pellikel. Das verwendete Araldit-Gemisch bestand aus Araldit (Cy 212, Serva, Heidelberg, Germany, 13824) zu 91 Teilen und zu 84 Teilen aus DDSA (2 Dodeceny succinic-acid anhydride, Serva, Heidelberg, Germany, 20755). Der Beschleuniger bestand aus 2, 4, 6-Tris(dimethylaminomethyl) phe-

nol (Serva, Heidelberg, Germany, 36975). Die Polymerisation erfolgte bei 65°C über 48 h.

Nach der Polymerisation konnten die eingebetteten Proben für die nachfolgende Ultramikrotomie vorbereitet werden. Die Kunstharzblöcke wurden zugespitzt und in eine Pyramidenform mit trapezförmiger Grundfläche zurechtgetrimmt. Die trapezförmige Anschnittfläche betrug ca. 0,3-0,8 mm. Mit Hilfe des Ultramikrotoms (Diamant- und Ultradünnschnittmesser, Mikrostar, Plano GmbH, Wetzlar) wurden nun Ultradünnschnitte in einer Dicke < 100 nm angefertigt. Zur Betrachtung im TEM wurden die fertigen Dünnschnitte noch mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

3.3.4 Beschreibung der Analysen mit dem AFM, dem Ellipsometer und dem TEM

3.3.4.1 AFM-Bilder:

Die AFM-Bilder wurden, wie in Abschnitt 3.1.4 bereits beschrieben, durchgeführt.

3.3.4.2 Analysen: Ellipsometrische Messungen

Die Ellipsometriedaten wurden, wie in Abschnitt 3.2.4. bereits beschrieben, erhoben.

Die bei einem vorgegebenen Brechungsindex von $n = 1,5$ ermittelten Schichtdicken d wurden in diesem Teil zusätzlich in die Größe „adsorbierte Menge“ umgerechnet. Diese Größe ermöglicht eine genauere Darstellung, da die mittels ellipsometrischer Grundgleichung errechnete Schichtdicke nur für eine homogene Schicht angegeben werden konnte.

Die Umrechnung erfolgte mittels folgender Gleichung:

$$\Gamma = d \times \frac{n_s - n_U}{\frac{d_n}{d_c}} [\text{mg/m}^2]$$

d = Dicke in nm

n_s = Brechungsindex Speichel (= 1,5)

n_U = Brechungsindex Umgebung (= 1)

d_n / d_c = Änderung des Brechungsindex mit der Konzentration (0,183 ml/g)

Die physikalisch genaue Beschreibung der Null-Ellipsometrie sowie die zu Grunde liegenden physikalischen Grundlagen zur Umrechnung der Pellikelschichtdicke in die adsorbierte Menge wurden ausführlich von Mantz (2008) beschrieben.

3.3.4.3 TEM-Analysen:

Die TEM-Bilder wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop (Tecnai G12, FEI Eindhoven, Niederlande) bei verschiedenen Vergrößerungen von 10.000-100.000fach angeschaut und es wurden Hellfeldabbildungen im Abbildungsmodus erstellt.

3.4 Überblick

Die folgende Tabelle 1 schafft einen Überblick über die durchgeführten In-situ-Experimente in der vorliegenden Studie:

Tabelle 1: Überblick über das Studiendesign.

1.AFM- Studie zur Pellikelmorphologie
Lokalisation: bukkal und palatinal an Oberkiefermolaren Probanden : 1-4 (KH, IK, HM, SGT) Proben: Platin-Araldit, Siliziumoxid-Wafer Intraorale Expositionszeit: 3 min, 30 min, 120 min Methode: AFM
2.Ellipsometrische Analyse der Pellikelbildung auf verschiedenen Substraten
Lokalisation: bukkal an Oberkiefermolaren Probanden: 3-4 (HM, SGT) Proben: Siliziumoxid-Wafer, OTS (hydrophobisierter Siliziumoxid-Wafer) Intraorale Expositionszeit: 3 min, 30 min, 120 min Methode: Ellipsometer
3.Methodenvergleich AFM, Ellipsometer, TEM
Lokalisation: bukkal an Oberkiefermolaren Probanden: 1-2 (KH, IK) Proben: Platin-Araldit Intraorale Expositionszeit: 30 min Methode: AFM, TEM, Ellipsometer

3.5 Statistik

Die statistische Auswertung der ellipsometrischen Analyse der Pellikelbildung erfolgte mit dem Statistikprogramm ANOVA (SPSS, Version 13).

4 ERGEBNISSE

4.1 AFM-Studie zur Pellikelmorphologie

In diesem Studienabschnitt wurde die morphologische Struktur der Pellikel näher untersucht. Die Platin-Araldit- und Siliziumoxid-Wafer-Proben wurden bukkal und palatinal in Höhe der oberen Molaren an einer Trageschiene angebracht und für 3 min, 30 min und 120 min dem intraoralen Milieu vier erwachsener Probanden ausgesetzt und die gewonnenen Pellikel wurden mit dem Rasterkraftmikroskop untersucht.

Zunächst entstanden AFM-Bilder eines reinen nativen Siliziumoxid-Wafers und einer nativen Araldit-Probe ohne Pellikelbehaftung, um Strukturen, die sich nach der Pellikeladsorption an der Prüfkörperoberfläche gebildet hatten, von der Materialoberflächenrauheit der reinen Substrate unterscheiden zu können (Abbildung 9).

Eine weitere Charakterisierung der Substratoberfläche nach der Platinbespaltung war nicht notwendig. Man konnte hier davon ausgehen, dass die Platinbespaltung die Araldit-Rauheit nicht wesentlich vergrößerte (Mantz 2008).

4.1.1 AFM-Analyse der Pellikelbildung auf bukkal getragenen Platin-Araldit-Proben

4.1.1.1 AFM-Analyse nach einer intraoralen Expositionszeit von 3 min

Nach einer intraoralen Expositionszeit von 3 min war bei den Probanden eine relativ homogene Pellikelmorphologie mit geringer Rauheit der Pellikel zu erkennen.

Die Morphologie gestaltete sich, wie in Abbildung 10a in einer Auflösung von $5 \times 5 \mu\text{m}$ zu sehen, mit einzelnen in der Darstellung dunkelblau gefärbten Löchern in der Pellikeloberfläche. Bei einer Vergrößerung der Bilddarstellung in einer Auflösung von $1 \times 1 \mu\text{m}$ zeigten sich die Löcher in der Pellikeloberfläche im Durchmesser in einer Größenordnung von bis zu ca. 55 nm (Abbildung 10b).

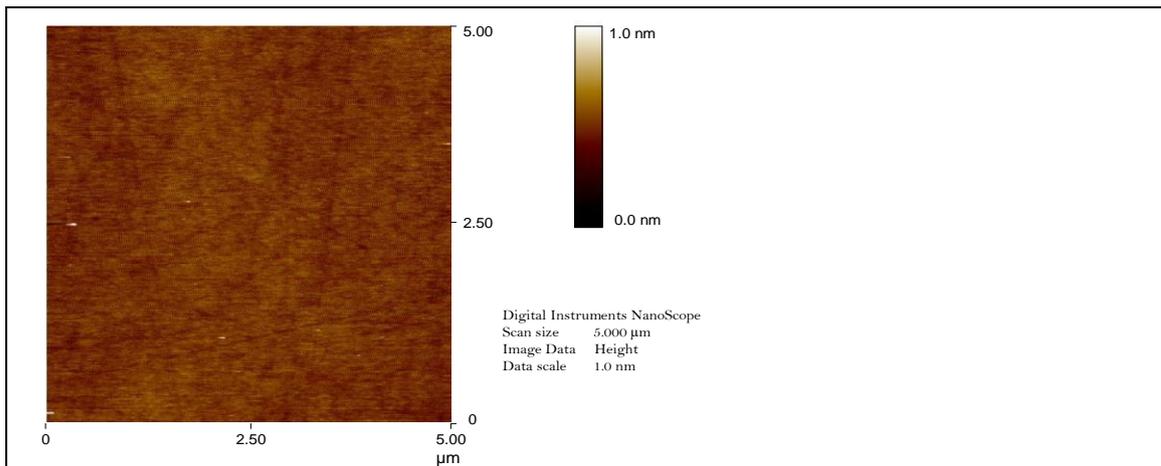


Abb. 9a: AFM-Aufnahme einer nativen Siliziumoxid-Wafer-Probe

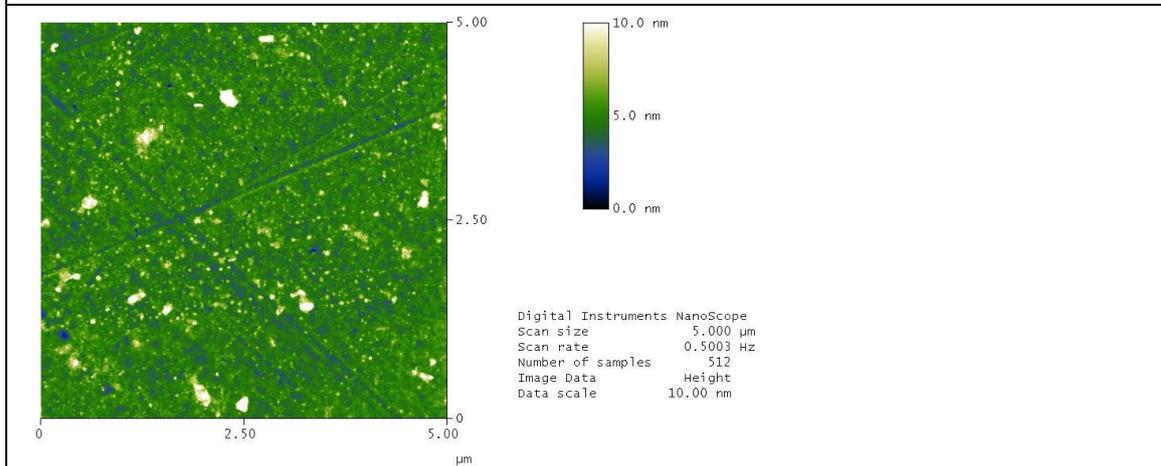


Abb. 9b: AFM-Aufnahme einer nativen Araldit-Probe

Abbildung 9: Referenzbilder der Substrate ohne Pellikelschicht

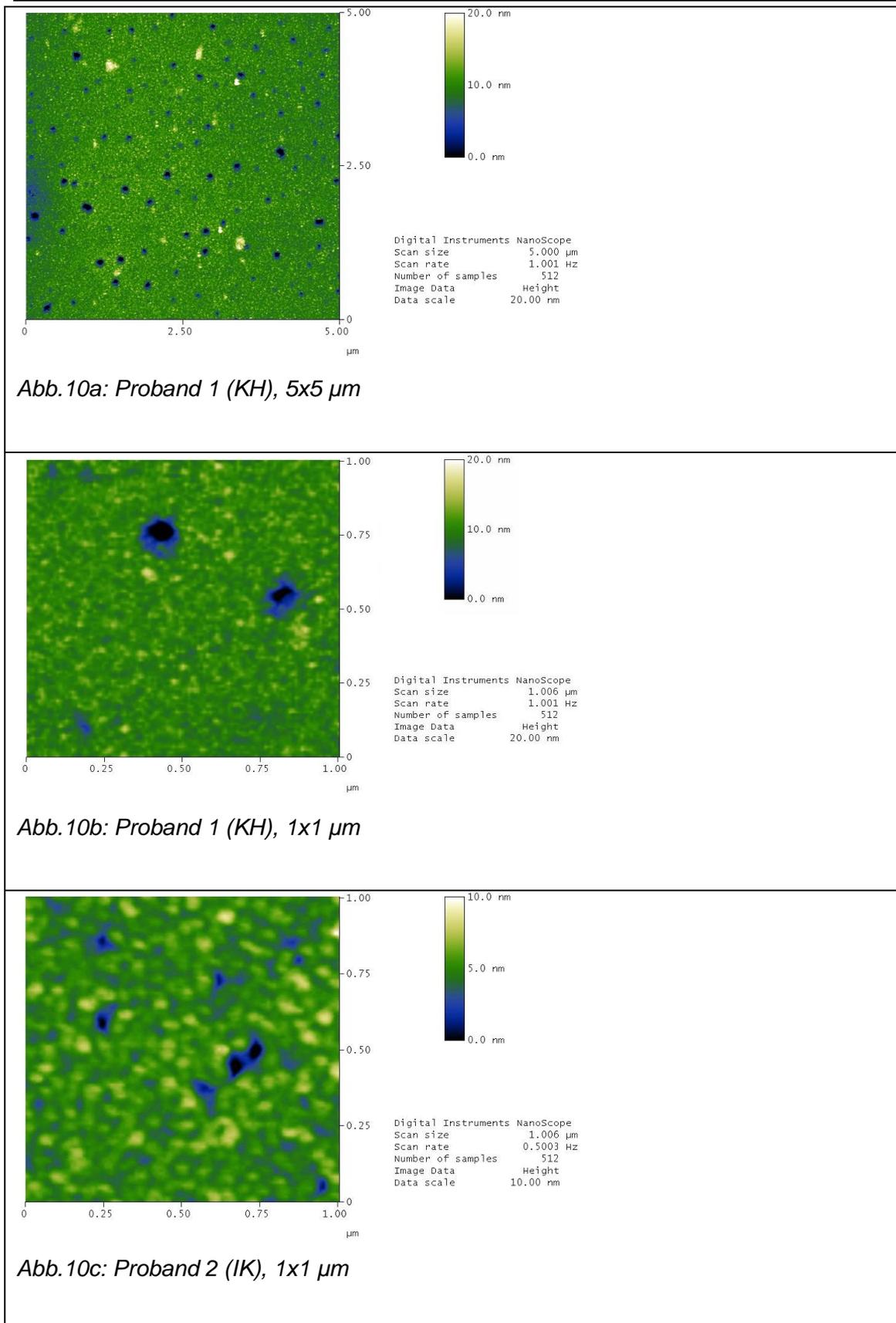


Abbildung 10: Die AFM-Darstellungen der bukkal gewonnenen Pellikel auf Pt-Araldit nach einer intraoralen Expositionszeit von 3 min zeigen eine homogene Oberflächenmorphologie mit einzelnen Löchern in der Oberfläche.

Das durchschnittliche Höhenprofil lag bei 5-12 nm mit einzelnen Peakbereichen, die in der Höhenskalierung ca. 8-15 nm betragen (Abbildungen 10a und 10c).

Die einzelnen Peaks erlangten Durchmesser von durchschnittlich ca. 17 nm (Abbildung 10c). In dieser vergrößerten Abbildung konnte man die homogene Oberflächenmorphologie ebenso erkennen.

4.1.1.2 AFM-Analyse nach einer intraoralen Expositionszeit von 30 min

Die 30-min-Pellikel wiesen im Vergleich zu den 3-min-Pellikel größere Variationen im mittleren Höhenprofil auf (0-50 nm, Abbildung 11a).

Das durchschnittliche Oberflächenhöhenprofil lag bei ca. 5-30 nm (Abbildungen 11a und 11c). In Abbildung 11a wurde die Pellikel im AFM-Bild mit einer Auflösung von 5x5 µm dargestellt und die vermehrt auftretenden globulären Strukturen im Vergleich zu den 3-min-Pellikeln wurden gut sichtbar. Die Oberfläche der in der Auflösung von 1x1 µm im AFM-Bild dargestellten Pellikel hatte gröbere, globuläre Strukturen mit mittleren Durchmessern von ca. 135 nm (Abbildung 11b).

In Abbildung 11c wurde die Pellikel wieder im AFM-Bild mit der Auflösung von 5x5 µm abgebildet und zeigte eine insgesamt verhältnismäßig dünnere Pellikelschicht von ca. 0-10 nm und noch flächig verteilte Löcher in der Pellikeloberfläche. Die stärkere granulär-globuläre Oberflächenmorphologie im Vergleich zur 3-min-Pellikel wurde auch hier deutlich.

4.1.1.3 AFM-Analyse nach einer intraoralen Expositionszeit von 120 min

Nach einer intraoralen Expositionszeit der Proben von 120 min wurde bei beiden Probanden eine Zunahme der globulären Pellikelanteile in der Oberflächenstruktur im Vergleich zu den 3 min und 30 min intraoral verbleibenden Proben sichtbar.

In Abbildung 12a mit einer Auflösung von 5x5 µm konnte man eine feine globuläre Pellikeloberfläche mit einem mittleren Höhenprofil von ca. 20-30 nm erkennen. Die globulären Anteile im mittleren Höhenprofil der Pellikel in der vergrößerten Darstellung im AFM-Bild von 1x1 µm Auflösung hatten einen ungefähren Durchmesser von 27 nm (Abbildung 12b). Die vereinzelt auftretenden Peakbereiche zeigten maximale Durchmesser von ca. 22 nm.

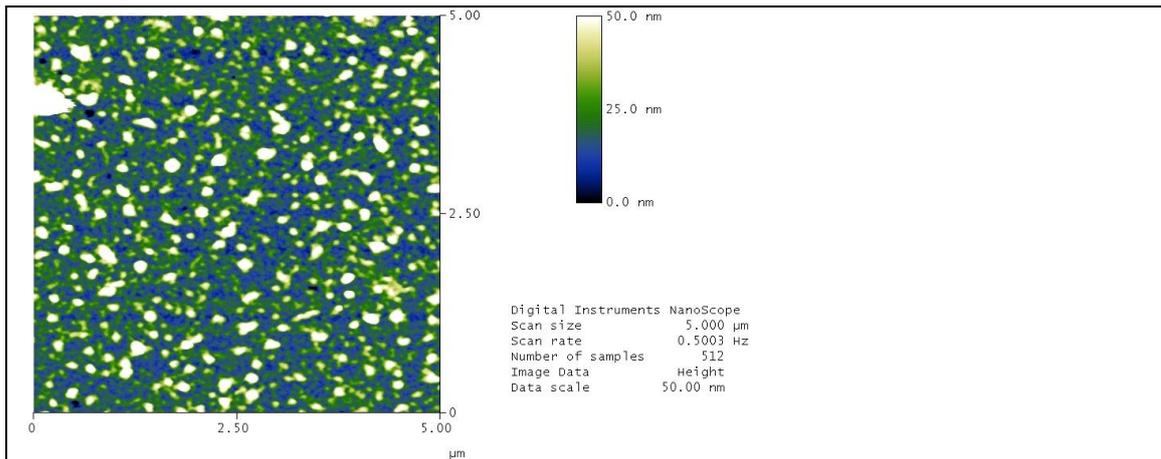


Abb. 11a: Proband 1 (KH), 5x5 μm

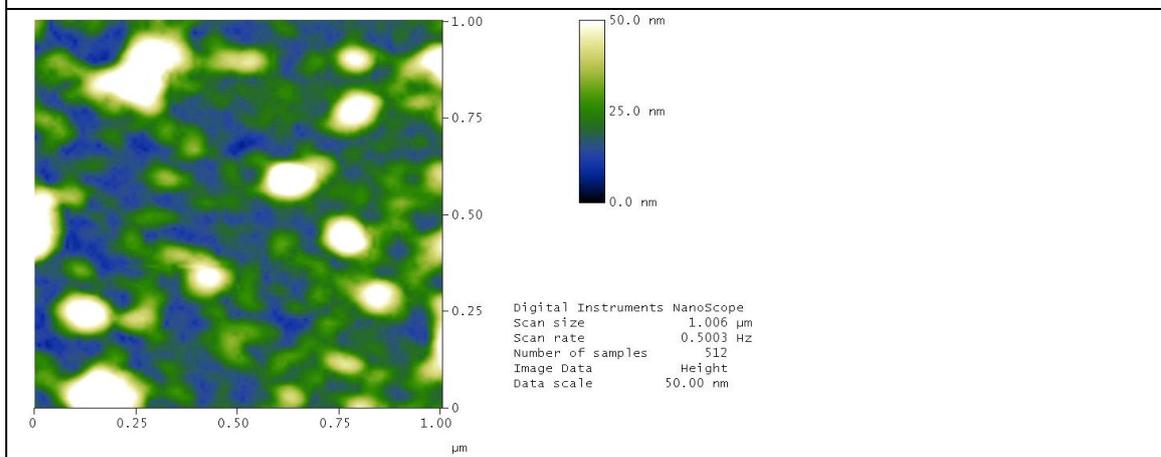


Abb. 11b: Proband 1 (KH), 1x1 μm

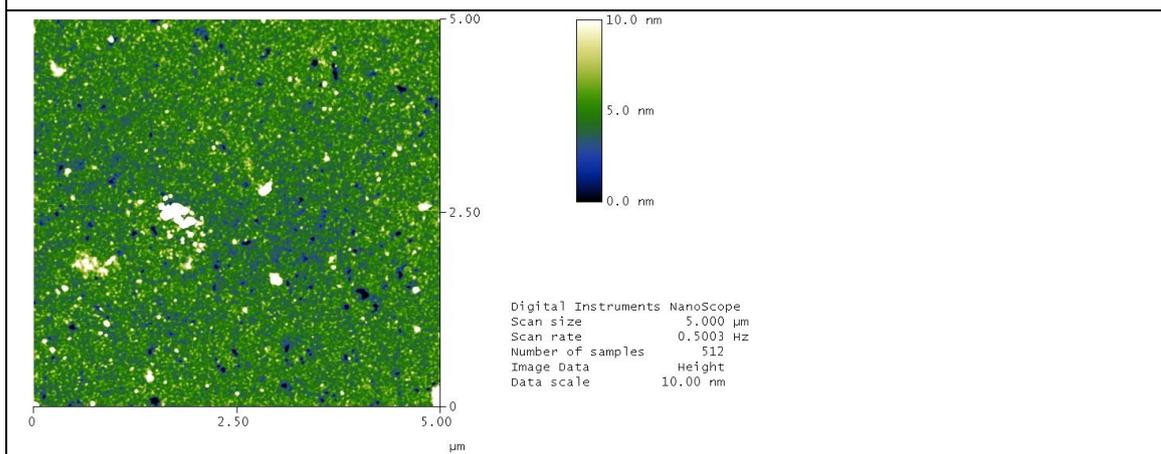


Abb. 11c: Proband 2 (IK), 5x5 μm

Abbildung 11: Die AFM-Darstellungen der bukkal gebildeten 30-min-Pellikel auf Pt-Araldit zeigen eine granuläre Oberflächenmorphologie mit globulären Strukturen und nur noch vereinzelt auftretende Löcher.

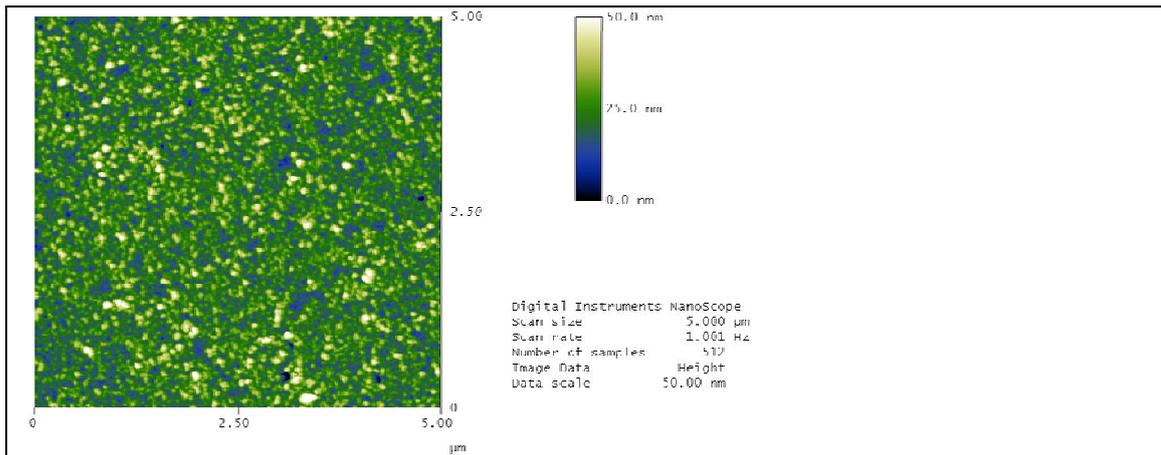


Abb. 12a: Proband 1 (KH), 5x5 μm

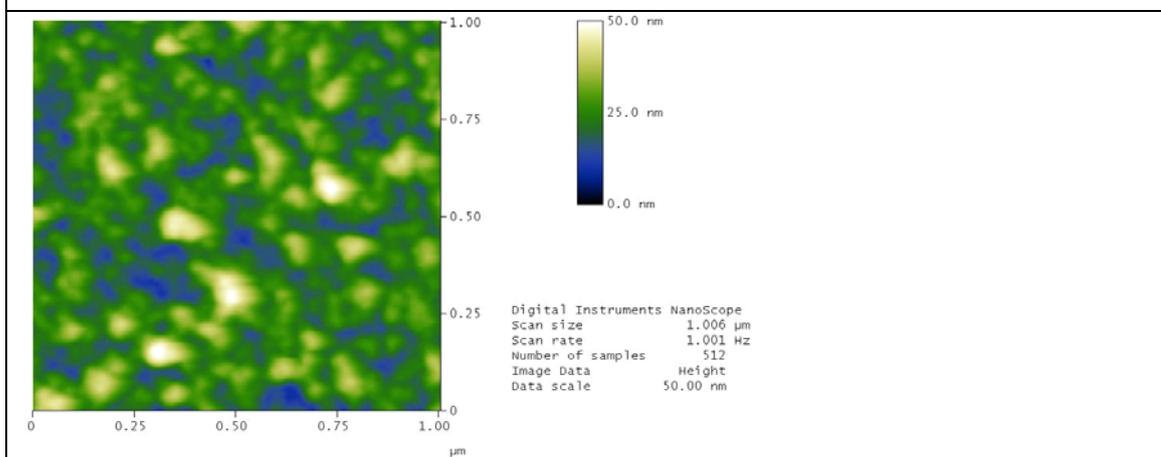


Abb. 12b: Proband 1 (KH), 1x1 μm

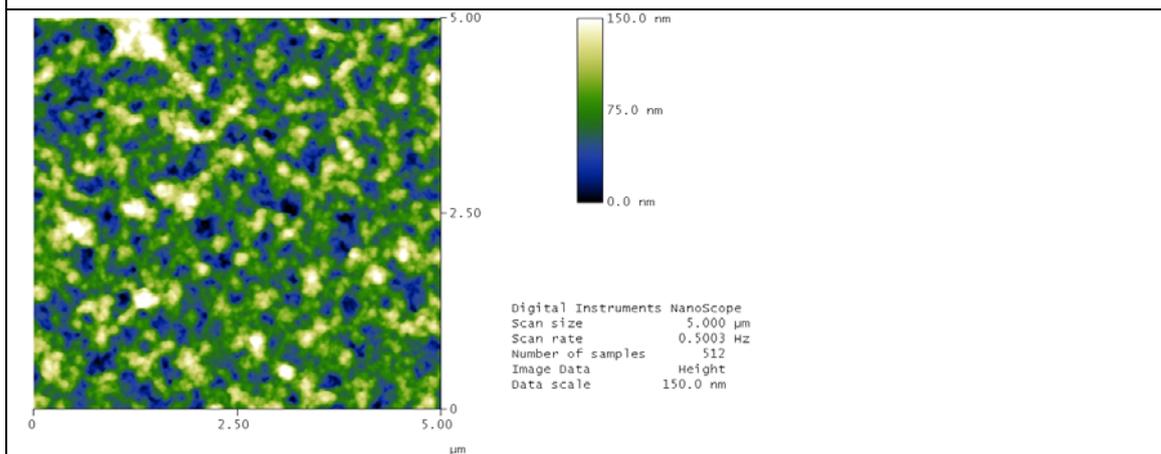


Abb. 12c: Proband 2 (IK), 5x5 μm

Abbildung 12: Nach 120-minütiger Expositionszeit stellt sich in der AFM-Analyse der bukkalen Pellikel auf Pt-Araldit ein weiterer Zuwachs der globulär-granulären Strukturen und ein höheres mittleres Oberflächenhöhenprofil dar.

Die in Abbildung 12c dargestellte 120-min-Pellikel, nochmals in einer Bildauflösung im AFM von $5 \times 5 \mu\text{m}$, wies im Vergleich zu den 3-min- und 30-min-Pellikel ein sehr viel höheres mittleres Oberflächenhöhenprofil auf. Ansonsten war die globulär-granuläre Struktur der Pellikel auch hier erkennbar.

Die globulären Pellikelstrukturen wurden mit längerer intraoraler Expositionszeit der Proben feingranulärer. Die 3-min-Pellikel zeigten noch gröbere Strukturen und Löcher in der Pellikeloberfläche. Nach längerer Expositionszeit der Substrate waren die Löcher nicht mehr zu sehen.

4.1.2 AFM-Analyse der Pellikelbildung auf palatinal getragenen Platin-Araldit-Proben

4.1.2.1 AFM-Analyse nach einer intraoralen Expositionszeit von 3 min

Auf den AFM-Aufnahmen der intraoral palatinal gewonnenen Pellikel war nach 3 min ebenfalls ein homogenes Pellikelrelief auszumachen.

Die AFM-Darstellungen mit einer Auflösung von $5 \times 5 \mu\text{m}$ zeigten ein mittleres Höhenprofil der Pellikel zwischen 5-10 nm (Abbildungen 13a und 13c).

Die linienförmig auftretenden Löcher hatten einen Durchmesser von ca. 21 nm, wie eine vergrößerte Aufnahme einer der Stellen in einer Auflösung von $1 \times 1 \mu\text{m}$ zeigte (Abbildung 13b). Die relativ homogen angeordneten globulären Strukturen der Pellikel zeigten maximale Durchmesser von ungefähr 2 nm (Abbildung 13b).

4.1.2.2 AFM-Analyse nach einer intraoralen Expositionszeit von 30 min

In der $5 \times 5 \mu\text{m}$ -Darstellung der 30-min-Pellikel (Abbildung 14a) war eine homogene feingranuläre Pellikeloberfläche im mittleren Höhenprofil von 12 nm zu erkennen. Einzelne Peaks bis zu einer Höhe von 15-20 nm mit einem flächenhaften Durchmesser von ca. 214 nm waren eventuell bedingt durch Verunreinigungen der Probe (Abbildung 14a).

Abbildung 14c zeigte ein ähnliches AFM-Bild in der Auflösung von $5 \times 5 \mu\text{m}$ mit einem mittleren Höhenprofil der Pellikel von ca. 8 nm. Es wies eine feine Verteilung der globulären, hier noch eher granulären Strukturen auf (Abbildung 14c).

Auch in der vergrößerten $1 \times 1 \mu\text{m}$ -Darstellung der 30-min-Pellikel war eine feine granuläre Körnung mit globulären Strukturen von ca. 8 nm bis maximal ca. 32 nm im Durchmesser zu sehen (Abbildung 14b).

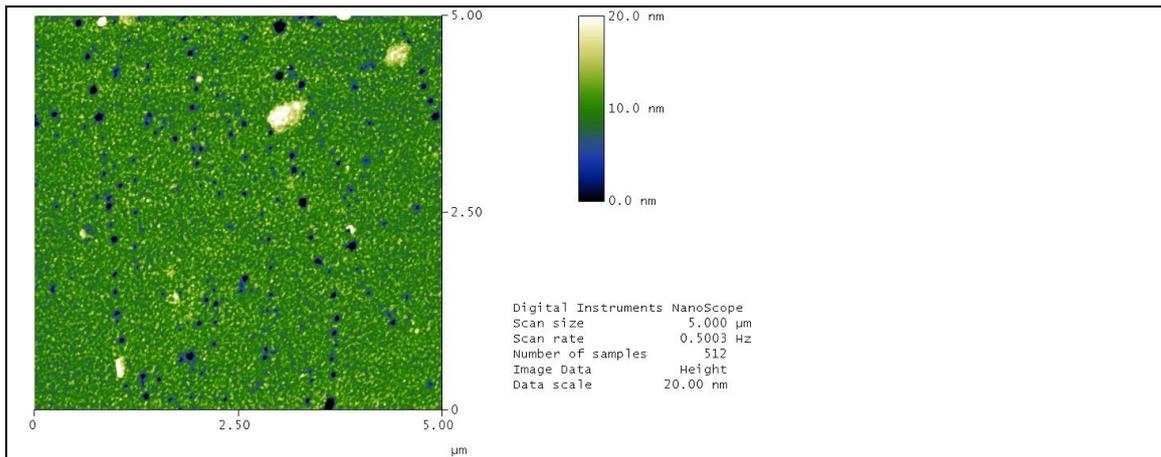


Abb. 13a: Proband 1 (KH), 5x5 μm

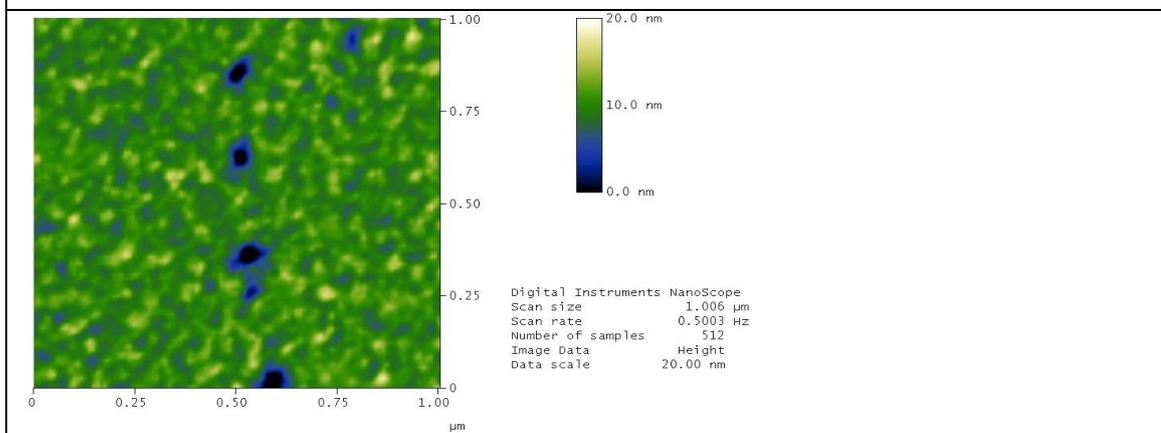


Abb. 13b: Proband 1 (KH), 1x1 μm

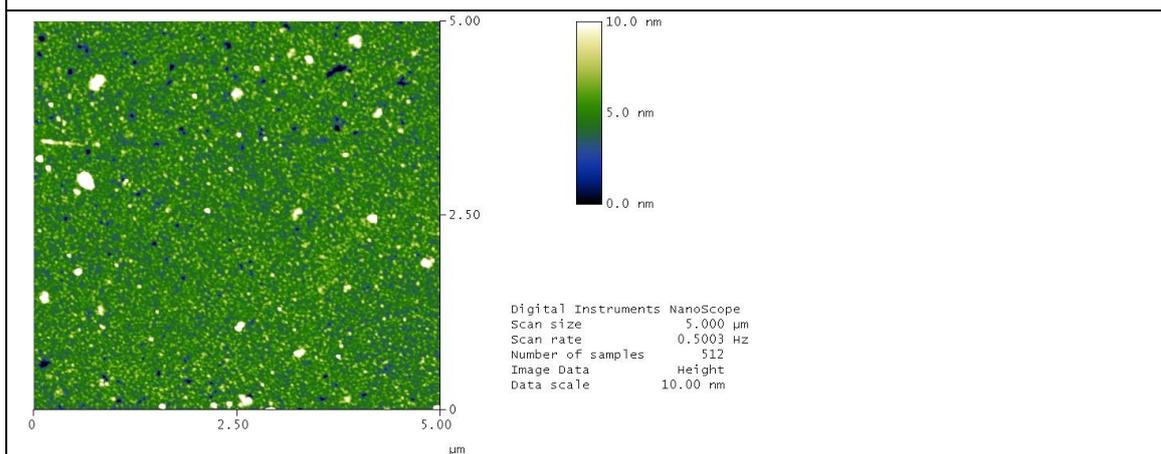


Abb. 13c: Proband 2 (IK), 5x5 μm

Abbildung 13: Die AFM-Darstellungen der palatinalen Pellikel auf Pt-Araldit nach einer 3-minütigen intraoralen Expositionszeit zeigen eine feine, homogene Oberflächenmorphologie und linienförmig verlaufende Löcher in der Pellikel.

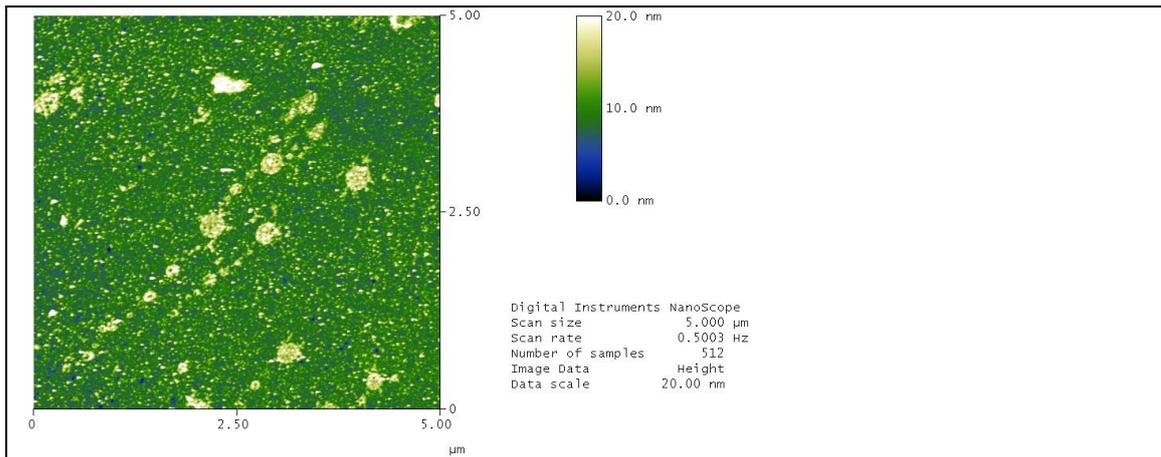


Abb. 14a: Proband 1 (KH), 5x5 μm

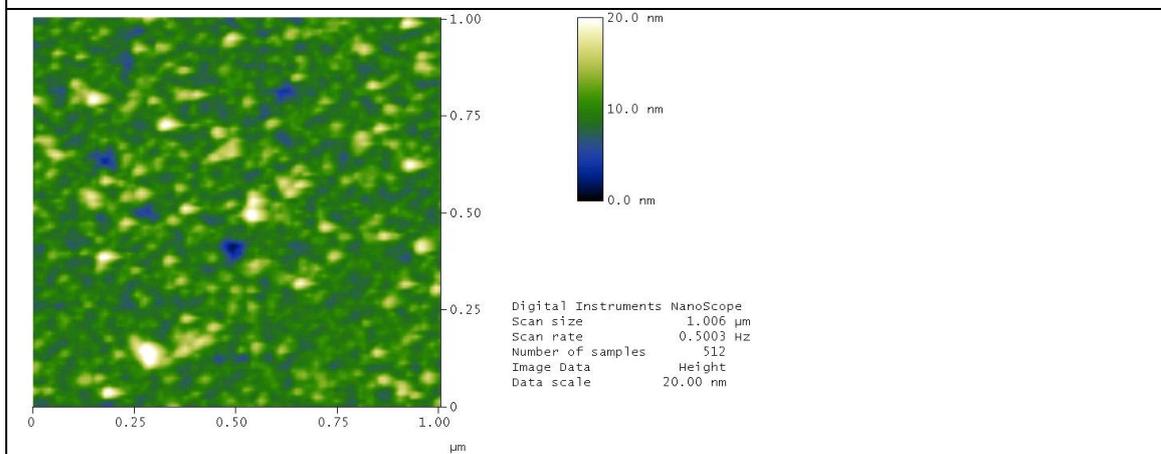


Abb. 14b: Proband 1 (KH), 1x1 μm

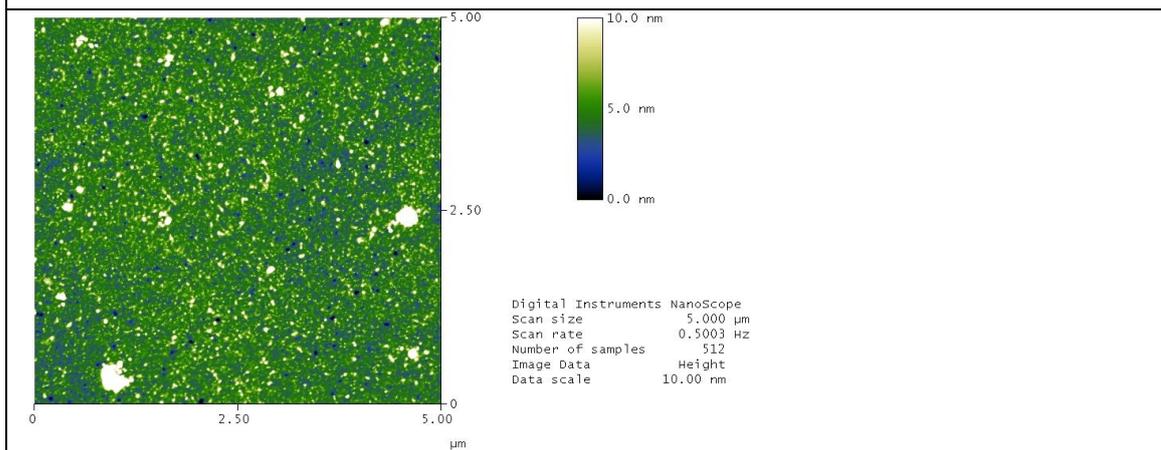


Abb. 14c: Proband 2 (IK), 5x5 μm

Abbildung 14: Die Zunahme der granulär-globulären Strukturen und die fein verteilte flächige Anordnung der Globuli ist auch in der AFM-Analyse der palatinalen 30-min-Pellikel auf Pt-Araldit sichtbar.

4.1.2.3 AFM- Analyse nach einer intraoralen Expositionszeit von 120 min

Die nach einer intraoralen Expositionszeit von 120 min palatinal gewonnenen Pellikelschichten hatten eine sehr viel feinere heterogene Oberflächenstruktur als die nach einer intraoralen Expositionszeit von 3 min oder 30 min gebildeten Pellikel. Einzelne weiß erscheinende flächige Peakbereiche, die in der $5 \times 5 \mu\text{m}$ aufgelösten Darstellung sichtbar wurden (Abbildung 15a), sprachen für eine stellenweise Verunreinigung der Probe.

In Abbildung 15b waren die globulären rundlichen Strukturen in der Pellikeloberfläche mit ca. 121 nm im Durchmesser wieder zu erkennen. Auch ein vergrößertes AFM-Bild in der Auflösung von $1 \times 1 \mu\text{m}$ (Abbildung 15c) verdeutlichte die homogene, fein verteilte globuläre Oberflächenstruktur der 120-min-Pellikel. Insgesamt befand sich das Oberflächenhöhenprofil der 120-min-Pellikel im Durchschnitt bei ca. 5-10 nm (Abbildungen 15a und 15b).

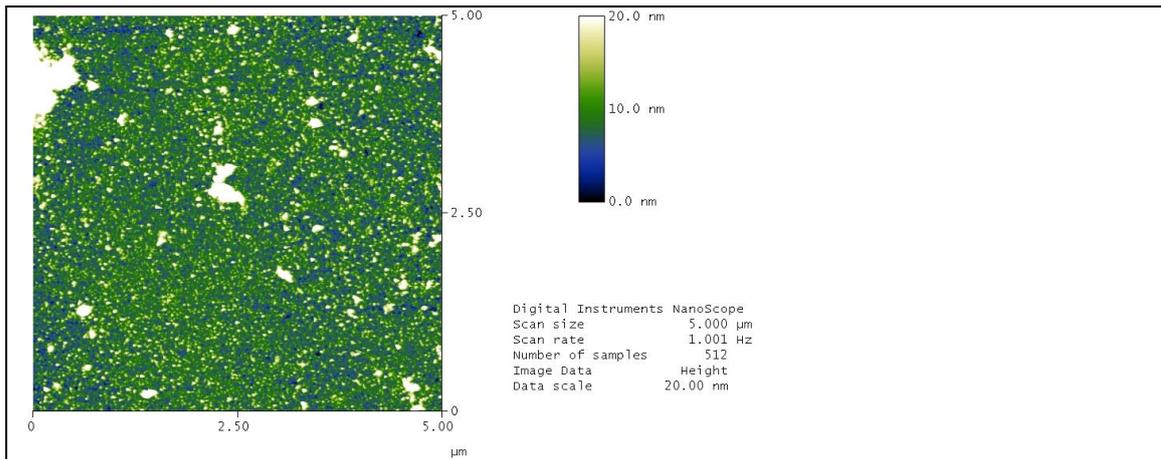


Abb. 15a: Proband 1 (KH), 5x5 μm

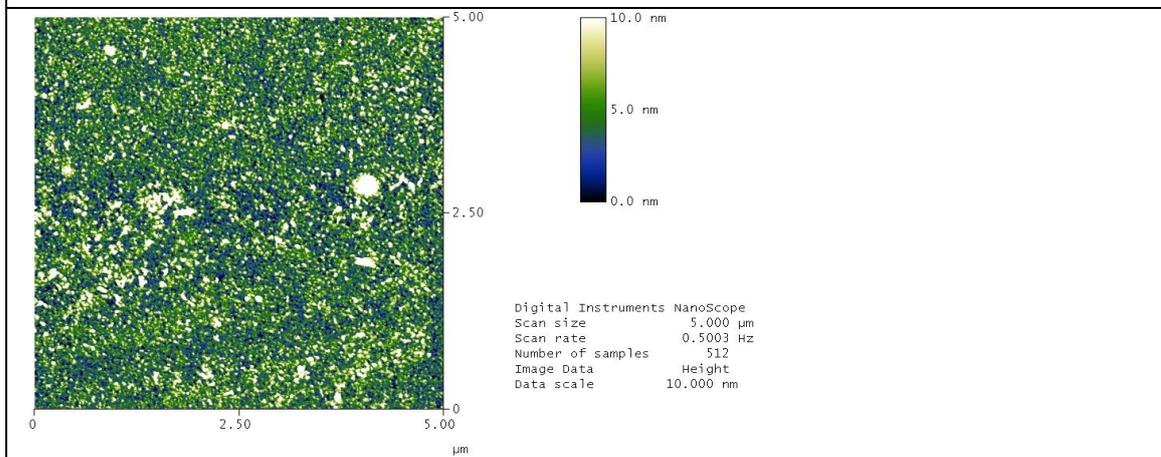


Abb. 15b: Proband 2 (IK), 5x5 μm

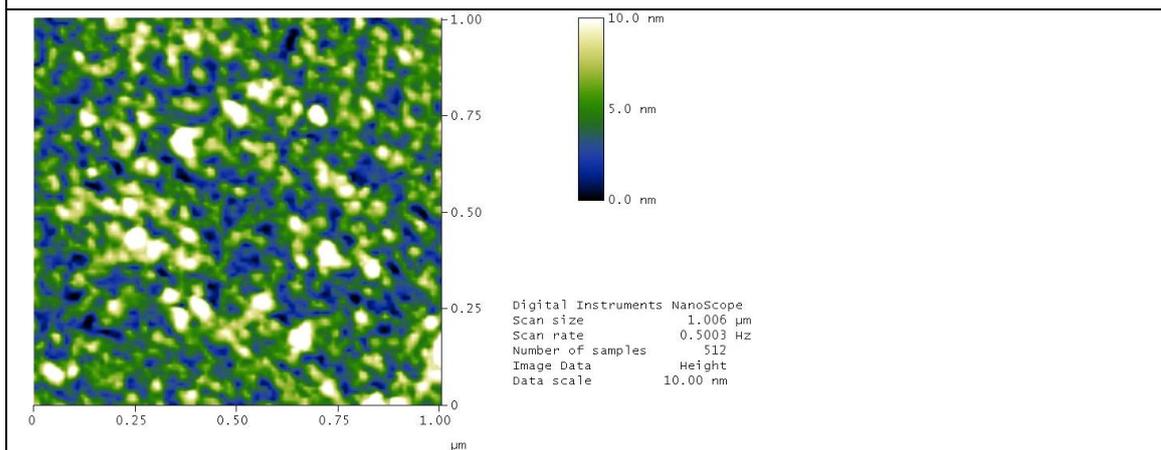


Abb. 15c: Proband 2 (IK), 1x1 μm

Abbildung 15: Die AFM-Darstellung der palatinal gewonnenen Pellikel auf Pt-Araldit nach einer intraoralen Expositionszeit von 120 min zeigt eine sehr fein verteilte heterogene Oberflächenmorphologie der Pellikel ohne Löcher.

4.1.3 AFM-Analyse der Pellikelbildung auf bukkal getragenen Siliziumoxid-Proben

4.1.3.1 AFM-Analyse nach einer intraoralen Expositionszeit von 3 min

Die in der Auflösung von $1 \times 1 \mu\text{m}$ im AFM-Bild dargestellte bukkal gebildete 3-min-Pellikel auf einem Siliziumoxid-Wafer zeigte eine recht homogene Oberflächenstruktur und einige rundlich-globuläre Peakbereiche (Abbildung 16a).

Die durchschnittlichen Durchmesser der globulären Strukturen lagen bei ca. 17 nm. Das mittlere Höhenprofil bewegte sich bei 2-2,5 nm.

In Abbildung 16b war dieselbe Pellikel in einer Vergrößerung von $100 \times 100 \text{ nm}$ dargestellt.

Die Abbildung 16c zeigte die Oberflächenmorphologie der 3-min-Pellikel in einer starken Vergrößerung von $500 \times 500 \text{ nm}$. Das mittlere Oberflächenhöhenprofil lag bei ca. 1,5 nm. Aufgrund des hohen Vergrößerungsfaktors war die Aufnahme unschärfer. Die granulär-globuläre Oberflächenmorphologie war jedoch deutlich zu sehen und die Globuli zeigten hier maximale Durchmesser von ca. 12 nm (Abbildung 16c).

4.1.3.2 AFM-Analyse nach einer intraoralen Expositionszeit von 30 min

Die AFM-Darstellung der 30-min-Pellikel, die bukkal auf einer Siliziumoxid-Wafer-Probe gewonnen wurde, zeigte große unregelmäßig umrandete, flächige weiße Stellen in der Oberflächenmorphologie, die nicht als Globuli der Pellikel zu deuten waren, sondern eher von Verunreinigungen der Probe vor der Pellikelgewinnung verursacht worden sind (Abbildung 17a).

An den nicht verunreinigten Stellen war die homogene Oberfläche der Pellikel erkennbar. Das mittlere Oberflächenprofil bewegte sich bei ca. 5-6 nm. Die globulären Strukturen hatten mittlere Durchmesser von ca. 27 nm (Abbildung 17a).

Auch in der größeren Auflösung von $500 \times 500 \text{ nm}$ waren die großen flächigen weißen Stellen in der Pellikeloberflächenmorphologie zu sehen. Die mittleren Globuli zeigten Durchmesser von bis zu 12 nm (Abbildung 17b) und die granuläre Struktur war neben den weißlichen Stellen wiederum deutlich sichtbar.

4.1.3.3 AFM-Analyse nach einer intraoralen Expositionszeit von 120 min

Nach einer 120-minütigen intraoralen Expositionszeit der Siliziumoxid-Wafer-Proben war im Vergleich zu den bukkal gewonnenen Proben mit geringerer

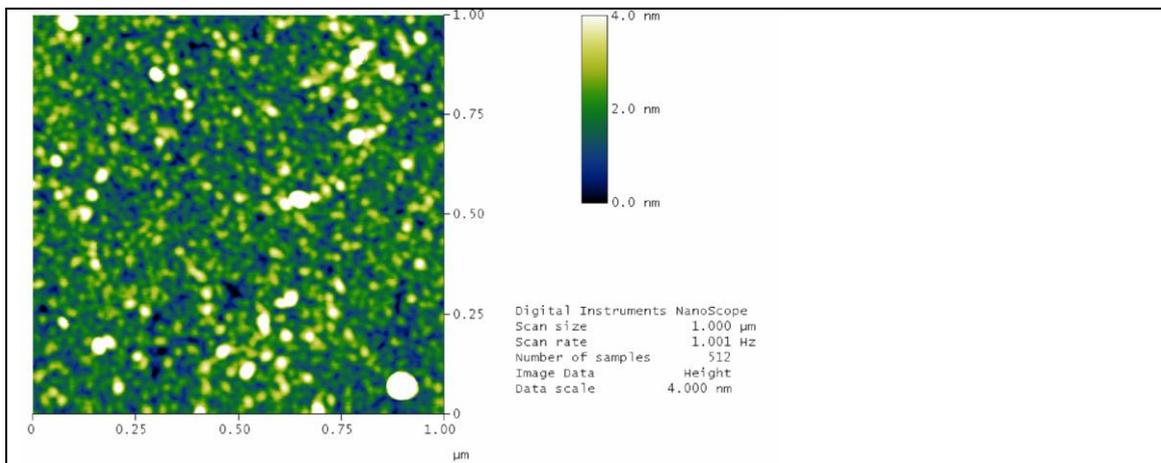


Abb. 16a: Proband 3 (HM), 1x1 μm

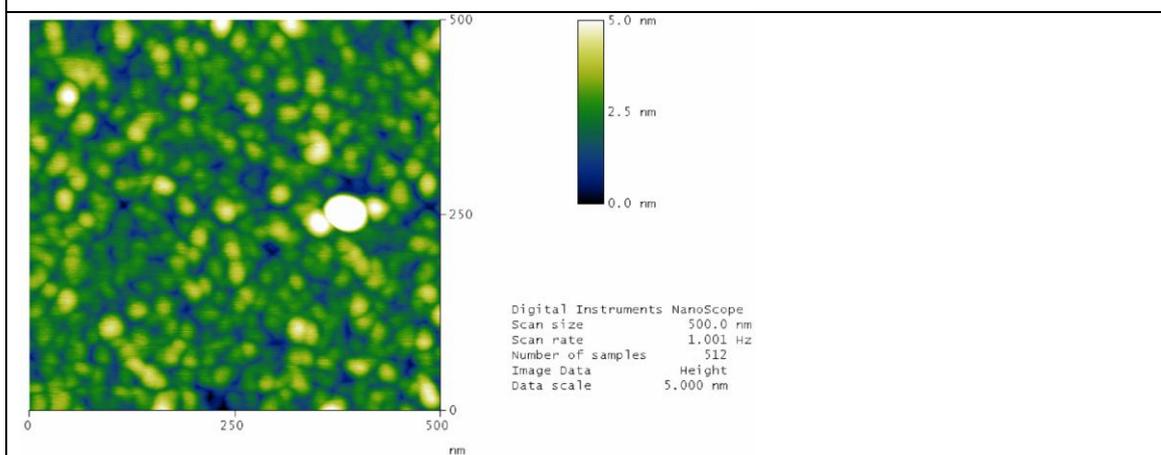


Abb. 16b: Proband 3 (HM), 100x100 nm

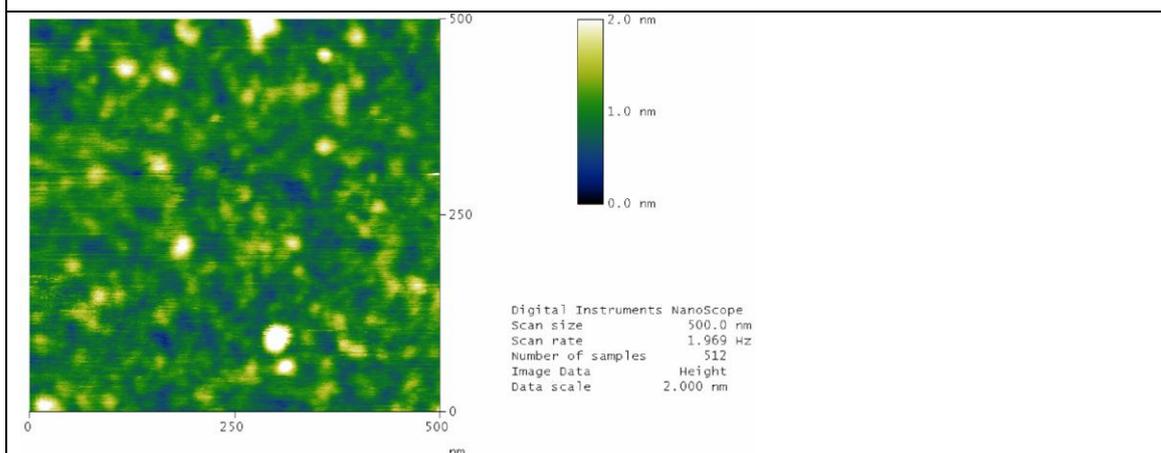


Abb. 16c: Proband 4 (SGT), 500x500 nm

Abbildung 16: Die AFM-Darstellungen zeigen die Oberflächenmorphologie der bukkal gewonnenen 3-min-Pellikel auf einem Siliziumoxid-Wafer. Die granuläre Struktur der Pellikel war nach den 3 min intraoralen Exposition der Substrate zu erkennen.

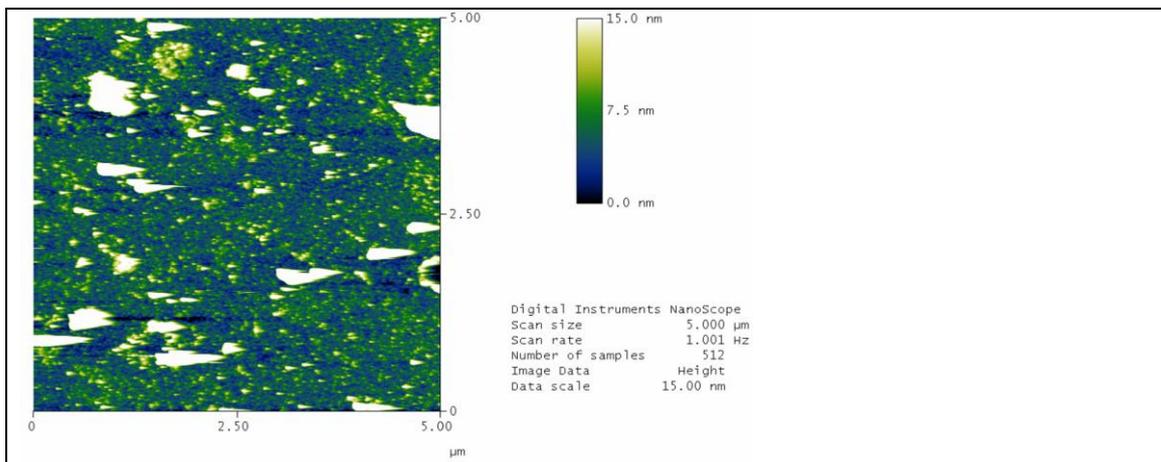


Abb. 17a: Proband 3 (HM), 5x5 μm

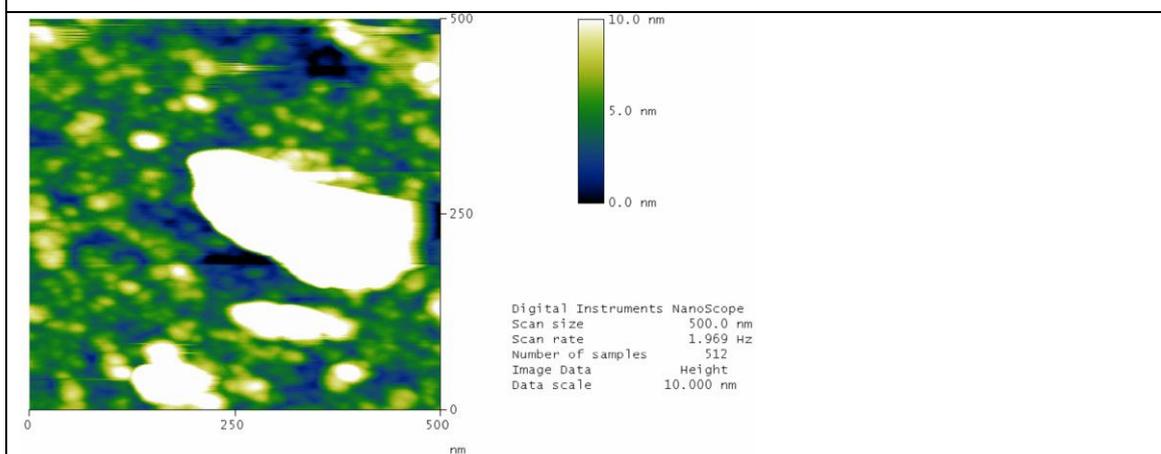


Abb. 17b: Proband 3, 500x500 nm

Abbildung 17: Die 30-min-Pellikel der bukkal gewonnenen Siliziumoxid-Wafer-Proben zeigen in der AFM-Darstellung einige flächige weiße Stellen, die evtl. von Verunreinigungen der Probe vor Aufnahme der Pellikel verursacht worden sind. Die homogene Oberflächenstruktur der Pellikel mit den granulär-globulären Anteilen ist dennoch zu sehen.

intraoraler Expositionszeit eine stärker heterogene Struktur im Oberflächenprofil der Pellikel auszumachen (Abbildung 18a).

Das mittlere Höhenprofil der Pellikel, dargestellt in Abbildung 18a mit der Auflösung von $5 \times 5 \mu\text{m}$, bewegte sich in einem Rahmen von ca. 10 nm. Die fein verteilten globulären Strukturen wiesen in dieser Probe Durchmesser von minimal ca. 26 nm und von maximal bis zu ca. 304 nm auf (weiß dargestellt).

In Abbildung 18b wurde die 120-min-Pellikel in einer stärkeren Vergrößerung von $1 \times 1 \mu\text{m}$ dargestellt. Die globulären Strukturen hatten einen maximalen Durchmesser von ca. 54 nm und die einzelnen runden Globuli zählten im Höhenprofil als Peakbereiche ca. 20 nm.

Abbildung 18c zeigte die Pellikel mit einem mittleren Höhenprofil des Oberflächenreliefs von ca. 8-15 nm. Rundliche globuläre Peakbereiche erstreckten sich zu einer maximalen Höhe von bis zu 20 nm und die einzelnen großen, globulären Strukturen wiesen maximale Durchmesser von ca. 49 nm auf. Aufgrund der starken Auflösung des AFM-Bildes von $500 \times 500 \text{ nm}$ ist die Abbildung 18c etwas unschärfer.

4.1.4 AFM-Analyse der Pellikelbildung auf palatinal getragenen Siliziumoxid-Proben

4.1.4.1 AFM-Analyse nach einer intraoralen Expositionszeit von 3 min

Abbildung 19a zeigte in einer hohen Bildauflösung von $200 \times 200 \text{ nm}$ die nach einer 3-minütigen intraoralen Expositionszeit palatinal gewonnene Pellikel. Auf der Siliziumoxid-Waferschicht waren einige dunkle und rundliche Löcher in der Pellikel zu erkennen. Das mittlere Höhenprofil bewegte sich zwischen 1-2,5 nm. Einzelne Peakbereiche innerhalb der Pellikel von bis zu 5 nm in der Höhenskallierung und mit Durchmessern von maximal ca. 2 nm waren ebenfalls zu sehen. Die Abbildung 19b stellte die Pellikel im AFM-Bild in einer geringeren Auflösung von $5 \times 5 \mu\text{m}$ dar. Das mittlere Oberflächenhöhenprofil lag bei ca. 2 nm und erschien insgesamt homogen. Einzelne Peakbereiche erreichten eine Höhe von 5 nm. Die granulären-globulären Strukturen hatten mittlere Durchmesser von ca. 26 nm.

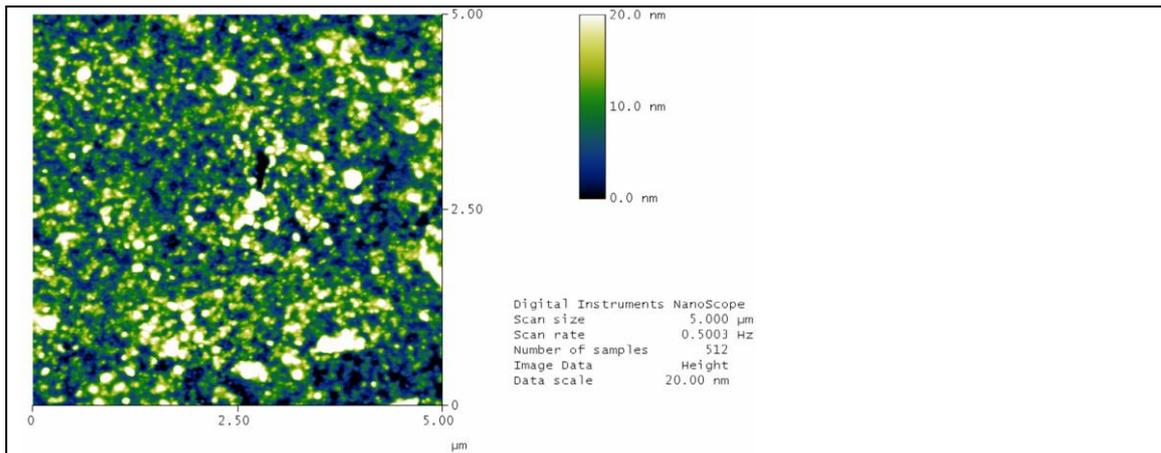


Abb. 18a: Proband 3 (HM), 5x5 μm

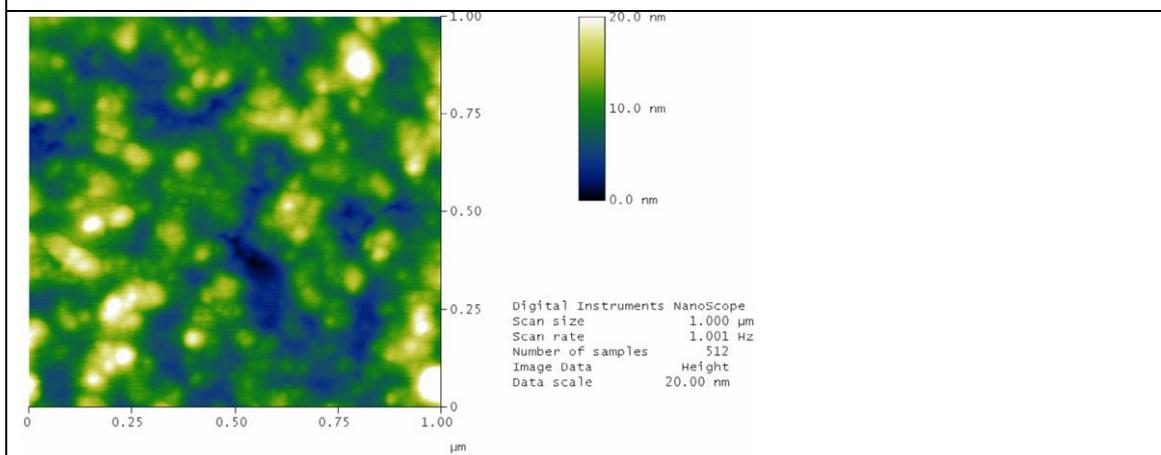


Abb. 18b: Proband 3 (HM), 1x1 μm

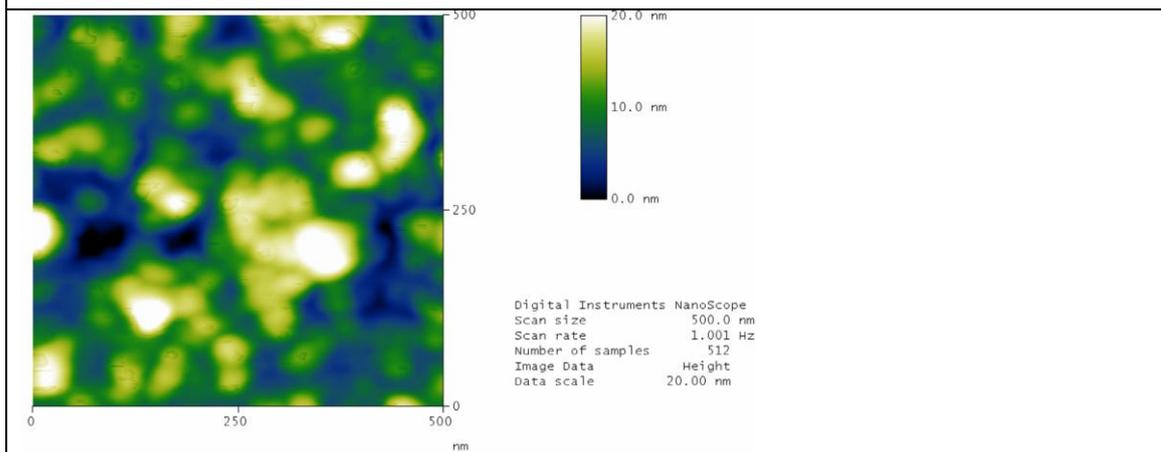


Abb. 18c: Proband 4 (SGT), 500x500 nm

Abbildung 18: Die bukkal gebildete 120-min-Pellikel auf dem Siliziumoxid-Wafer zeigt bei der AFM-Analyse eine deutlich heterogene Oberflächenkörnung mit kleineren und größeren Globuli.

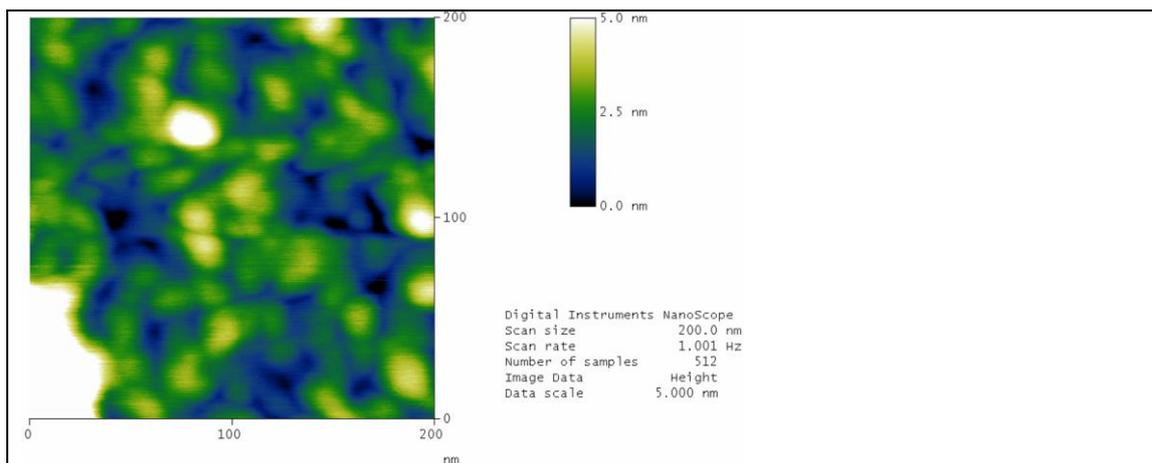


Abb. 19a: Proband 3 (HM), 200x200 nm

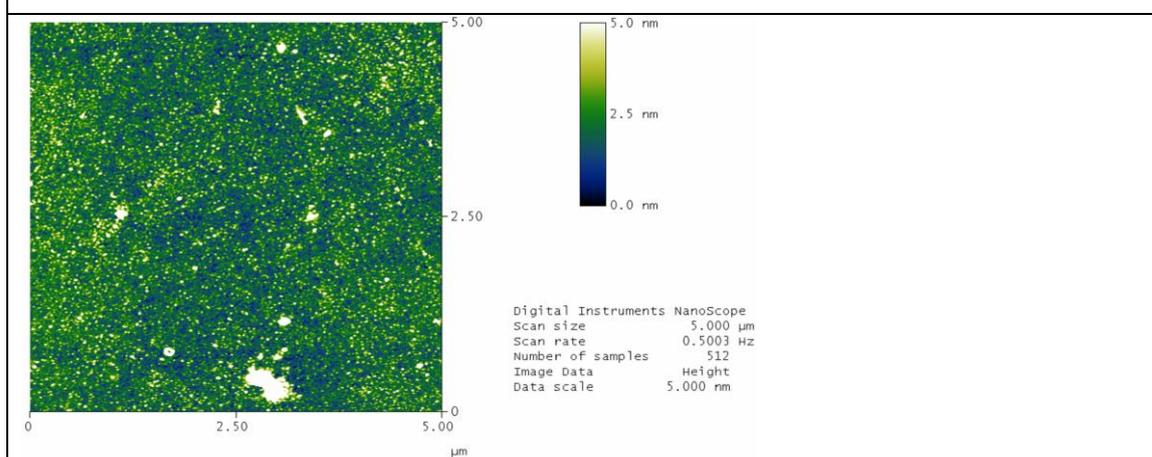


Abb. 19b: Proband 4 (SGT), 5x5 μm

Abbildung 19: Die nach einer 3-minütigen Expositionszeit palatinal gebildete Pellikel auf Siliziumoxid-Wafer weist im AFM-Bild eine homogene Verteilung granulärer Strukturen auf.

4.1.4.2 AFM-Analyse nach einer intraoralen Expositionszeit von 30 min

Abbildung 20a zeigte das AFM-Bild einer nach 30-minütiger Expositionszeit palatinal gebildeten Pellikel auf einem Siliziumoxid-Wafer. Die granulär-globulären Strukturen waren sehr deutlich ausgeprägt und hatten maximale Durchmesser von ca. 36 nm (Abbildung 20a).

Die globulären Strukturen maßen im Höhenprofil maximal 3-5 nm (Abbildung 20a und 20c).

In Abbildung 20c lag das mittlere Höhenprofil der Pellikel bei ca. 3 nm. Bei einer vergrößerten Darstellung von 200x200 nm der 30-min-Pellikel lag es bei nur ca. 1-2 nm (Abbildung 20b).

In Abbildung 20b waren die Peakbereiche mit unterschiedlich großen Durchmessern der Globuli von maximal bis ca. 2 nm zu sehen. Etwas inhomogener verteilte globuläre Peakbereiche mit einer Höhe von um die 5 nm im Oberflächenprofil waren ebenso in der Bildauflösung von 1x1 µm in Abbildung 20c zu erkennen. Die mittleren Durchmesser der weiß abgebildeten Globuli betragen ca. 8 nm. Allerdings waren auch nach 30-minütiger Exposition stellenweise noch einige Löcher in der Pellikeloberfläche zu erkennen (siehe Abbildung 20c).

4.1.4.3 AFM-Analyse nach einer intraoralen Expositionszeit von 120 min

Die nach 120 min palatinal gewonnenen Pellikelproben erwiesen sich im Oberflächenprofil etwas feingranulärer.

Abbildung 21a zeigte eine sehr heterogen verteilte, granulär-globuläre Oberflächenstruktur der Pellikel auf dem Siliziumoxid-Wafer in einer Auflösung von 5x5 µm. Das mittlere Oberflächenhöhenprofil lag bei ca. 1-3 nm und es waren einzelne Peakbereiche mit einer Höhe von ca. 5 nm im Höhenprofil zu erkennen (Abbildung 21b). Die Globuli, im AFM-Bild in der vergrößerten Auflösung von 500x500 nm in Abbildung 21b gut zu sehen, hatten maximale Durchmesser von ca. 17 nm.

Die Abbildung 21c zeigte die 120-min-Pellikel im AFM-Bild ebenfalls in einer Auflösung von 500x500 nm. Die Oberflächenstruktur der Pellikel gestaltete sich ähnlich der in den Abbildungen 21a und 21b gezeigten Pellikel. Die abgebildeten Globuli wiesen max. 5 nm im Höhenprofil auf (Abbildung 21c).

In allen gezeigten Abbildungen konnte man immer noch einzelne dunkelblau gefärbte Löcher in der Pellikeloberfläche ausmachen.

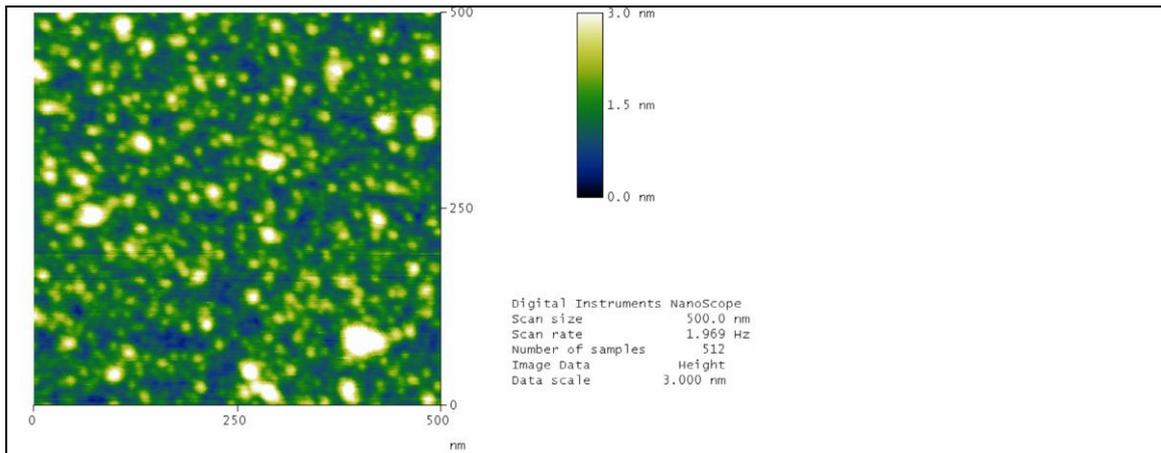


Abb. 20a: Proband 3 (HM), 500x500 nm

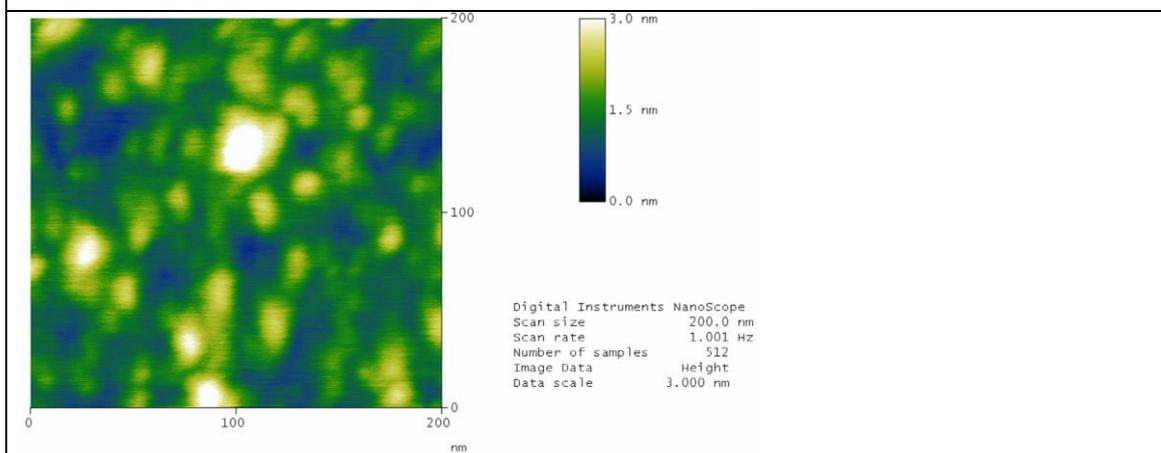


Abb. 20b: Proband 3 (HM), 200x200 nm

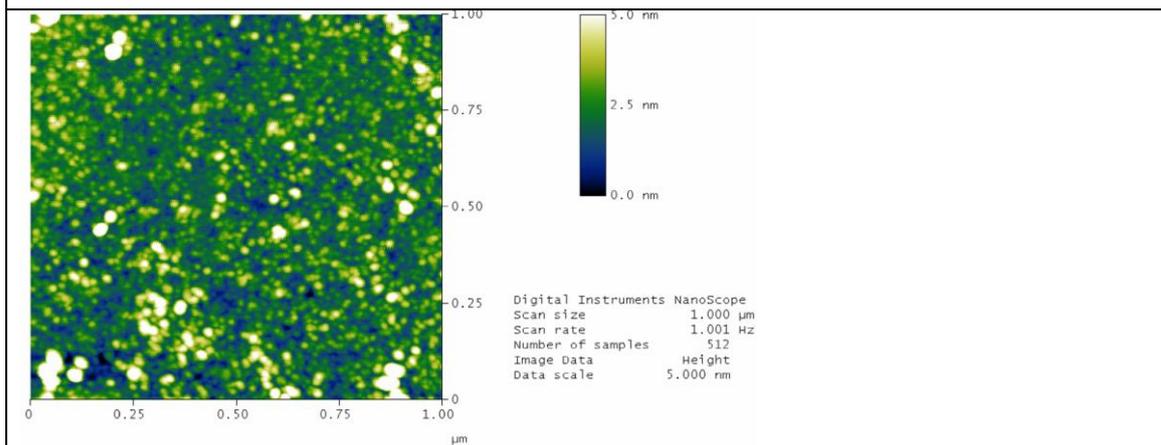


Abb. 20c: Proband 4 (SGT), 1x1 µm

Abbildung 20: Die palatinal auf Siliziumoxid-Wafer gebildete Pellikel hat nach 30-minütiger intraoraler Expositionszeit im AFM-Bild eine globuläre Struktur mit inhomogen verteilten größeren Globuli in der Oberflächenmorphologie.

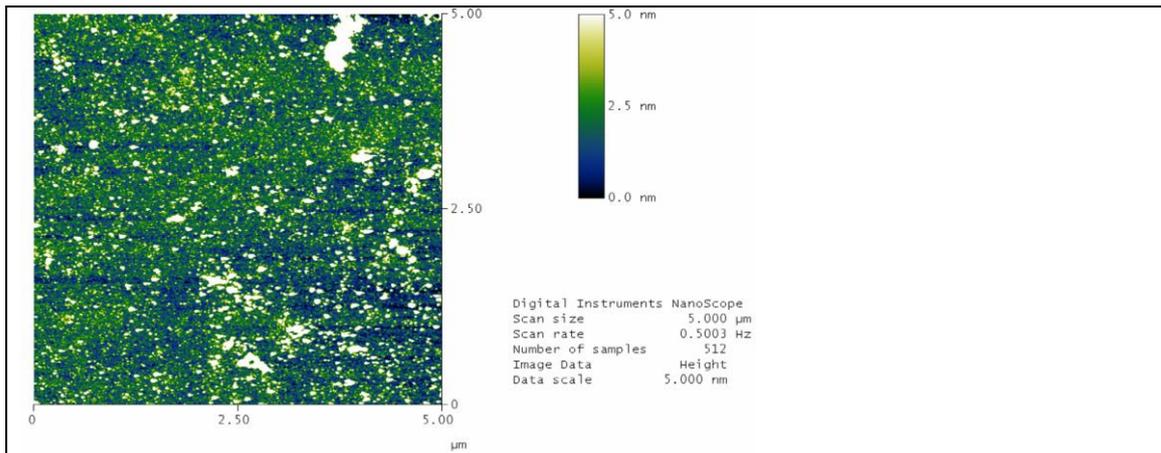


Abb. 21a: Proband 3 (HM), 5x5 μm

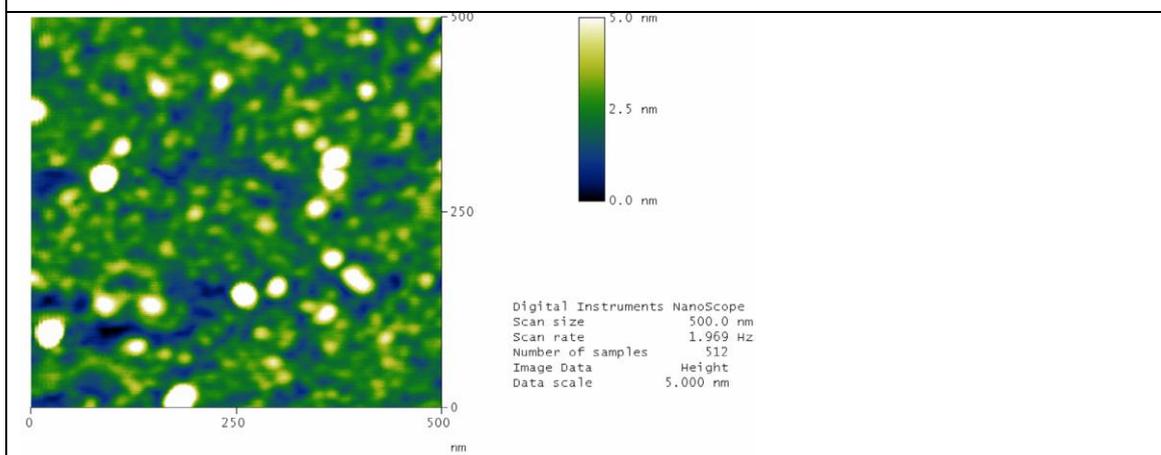


Abb. 21b: Proband 3 (HM), 500x500 nm

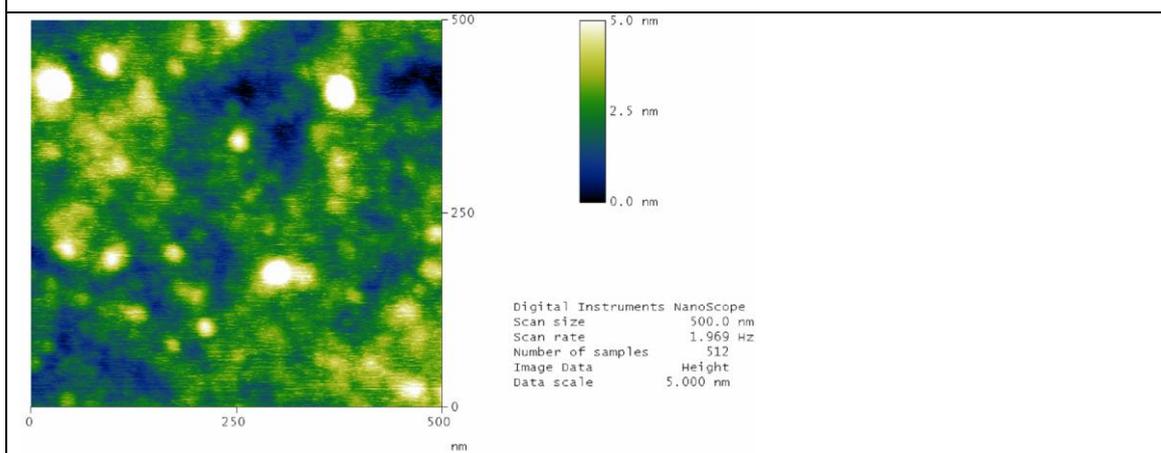


Abb. 21c: Proband 4 (SGT), 500x500 nm

Abbildung 21: Nach 120-minütiger Expositionszeit der Siliziumoxid-Wafer-Proben zeigt sich die Pellikel in der AFM-Darstellung sehr feingranulär mit heterogen verteilten, wieder kleineren globulären Strukturen mit mittleren Durchmessern von ca. 17 nm.

4.1.5 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

Bei der Auswertung der AFM-Bilder war zu bedenken, dass es sich zunächst um eine rein bildgebende Pellikeldarstellung handelte. Die zur Auswertung der aufkommenden Fragen genutzten Werte waren keine gemessenen, sondern aus den Bildern abgelesene Werte. Die in den folgenden Diagrammen beschriebene Schwankungsbreite des Oberflächenprofils der Pellikel, gemessen in nm, ist daher als abgelesener Wert relativ zu bewerten. Bei der AFM-Auswertung ging es um die Darstellung der Oberflächenmorphologie der Pellikel. Die reale Schichtdicke der Pellikel war den Bildern nicht zu entnehmen.

4.1.5.1 Substratvergleich

Gibt es Unterschiede in der Oberflächenmorphologie der Pellikel auf Platin-Araldit- und Siliziumoxid-Wafer-Proben?

In Diagramm 1 wurde eine schematische Gegenüberstellung der aus den AFM-Bildern ermittelten Schwankungsbreite des Oberflächenhöhenprofils der Pellikel auf Pt-Araldit und dem Siliziumoxid-Wafer nach den drei Expositionszeiten vorgenommen.

Nach einer 3-minütigen Expositionszeit der Substrate trat bei den beiden Materialien ein deutlicher Unterschied auf. Das Oberflächenhöhenprofil der Pellikel war bei den bukkal gewonnenen Pt-Araldit-Proben mit 5-12 nm im Höhenprofil sowie bei den palatinal gewonnenen mit ca. 5-10 nm deutlich verschieden zu den bukkal gewonnenen Siliziumoxid-Wafer-Proben mit nur ca. 1,5-2,5 nm und den palatinal gewonnenen Proben mit ebenfalls nur ca. 1-2,5 nm im Höhenprofil (Diagramm 1a).

Das ermittelte Höhenprofil der Pellikel nach 30-minütiger intraoraler Expositionszeit der Proben zeigte ein ähnliches Bild bei der Gegenüberstellung der zwei Materialien. Die in Diagramm 1b dargestellte Schwankungsbreite der mittleren Oberflächenhöhenprofile hatten auf Pt-Araldit bei den bukkal gewonnenen Proben einen Wert von 5-30 nm und bei den palatinal gewonnenen einen Wert von 8-12 nm. Demgegenüber standen die auf Siliziumoxid-Wafer-Proben gewonnenen Pellikel, die bukkal im Höhenprofil ca. 5-6 nm aufwiesen und palatinal nur ca. 1-3 nm.

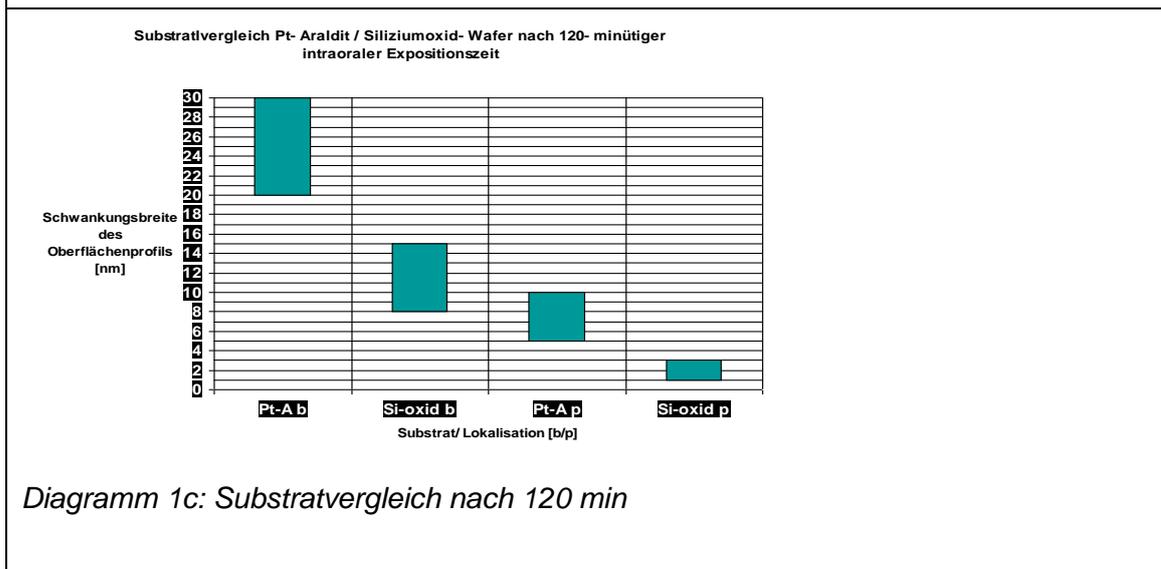
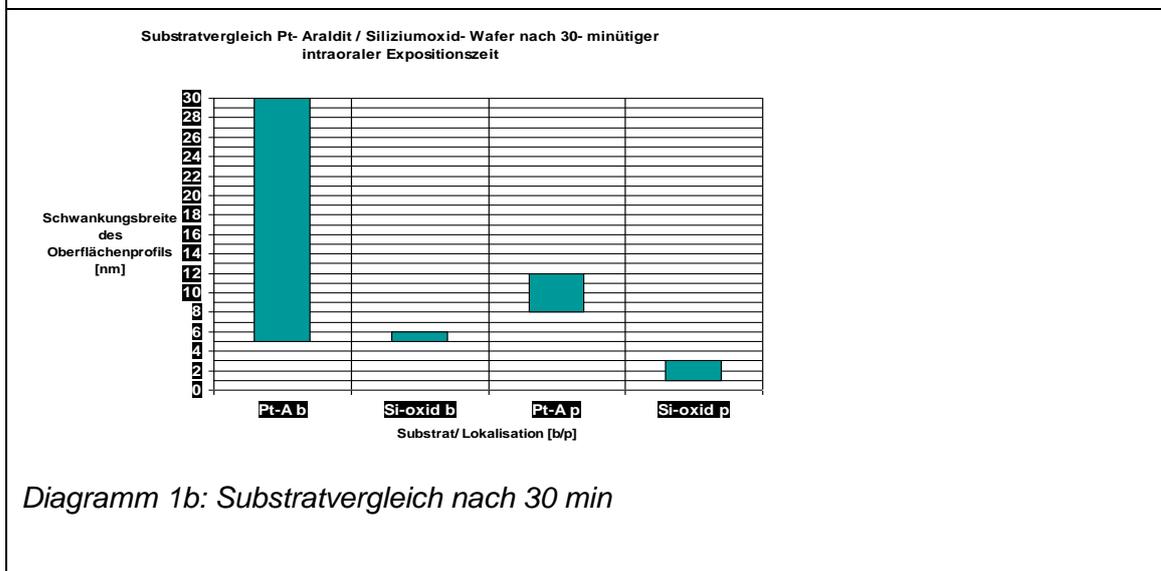
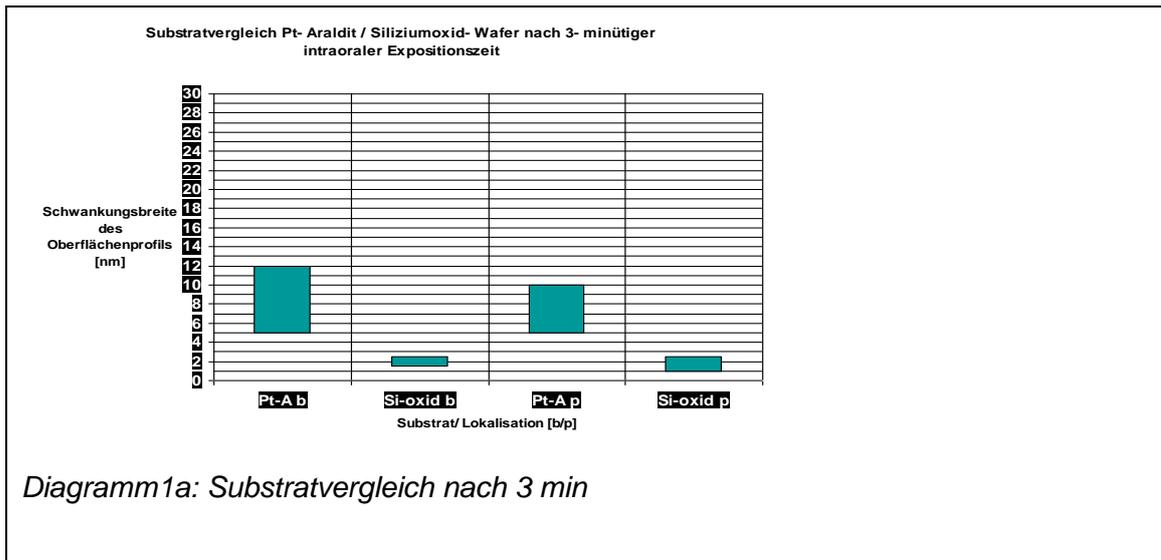


Diagramm 1: Substratvergleich von Pt-Araldit und Siliziumoxid-Wafer im Hinblick auf das Oberflächenprofil der Pellikel nach den drei verschiedenen intraoralen Expositionszeiten.

Nach 120-minütiger intraoraler Expositionszeit war der Unterschied der verschiedenen Materialien hinsichtlich des Oberflächenhöhenprofilbildes nicht mehr so deutlich ausgeprägt, aber dennoch vorhanden (Diagramm 1c). Die auf Pt-Araldit bukkal gebildeten 120-min-Pellikelschichten wiesen eine Schwankungsbreite des Höhenprofils von ca. 20-30 nm auf, die auf Siliziumoxid-Wafer bukkal gebildeten Pellikel hingegen nur von ca. 8-15 nm. Die Schwankungsbreite des Höhenprofils der palatinal gewonnenen Proben auf Pt-Araldit war mit 5-10 nm noch höher als die der palatinal gebildeten Pellikelschichten auf Siliziumoxid-Wafer-Proben mit ca. 1-3 nm.

4.1.5.2 Vergleich der Expositionszeiten

Gibt es Unterschiede in der Oberflächenmorphologie der Pellikel abhängig von den unterschiedlichen intraoralen Expositionszeiten?

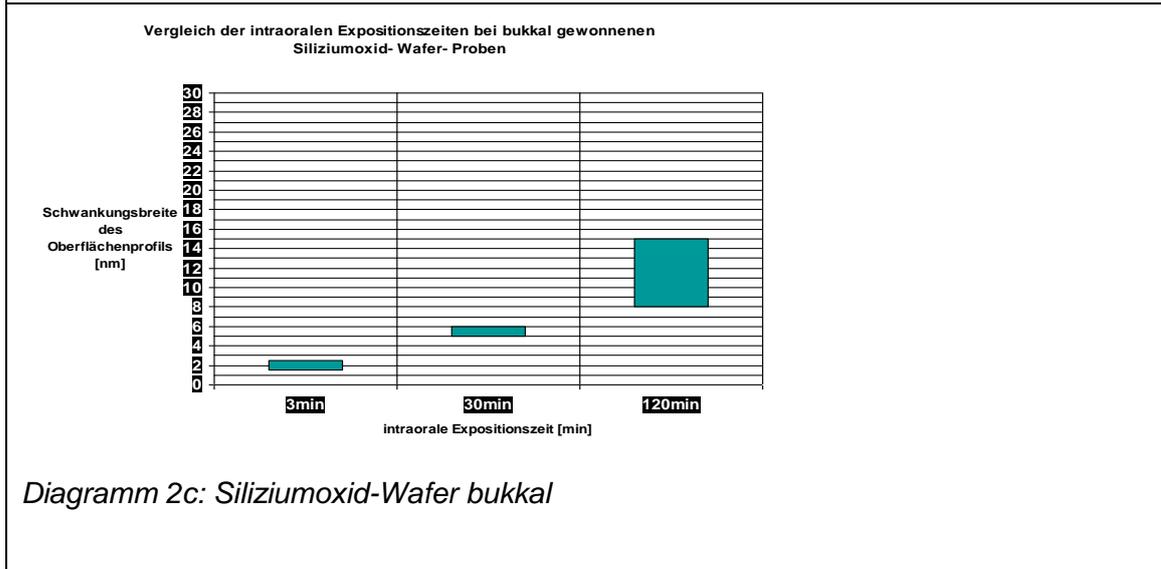
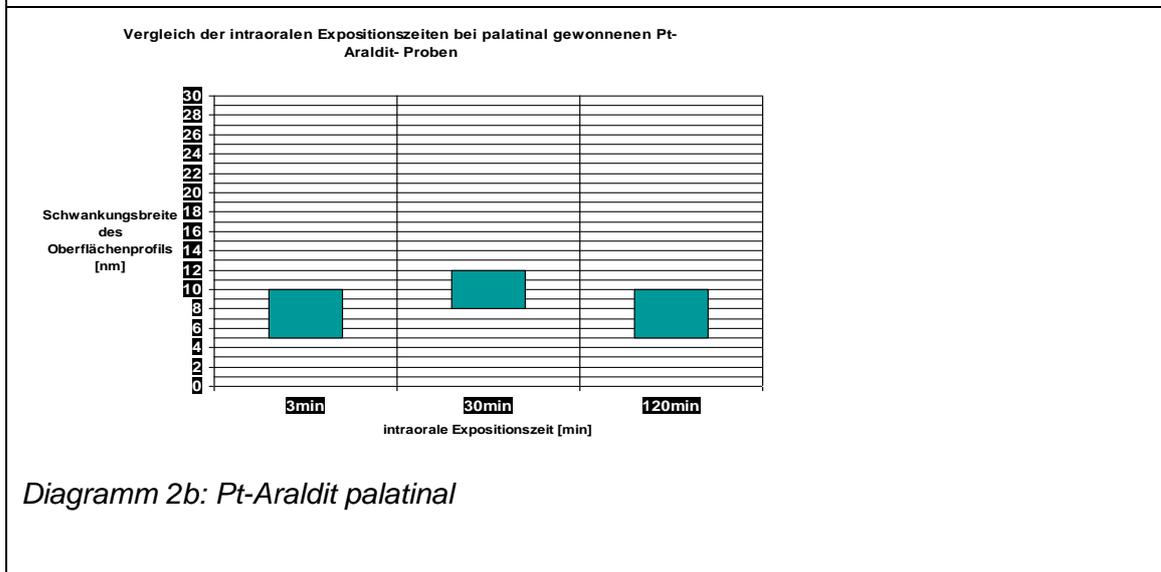
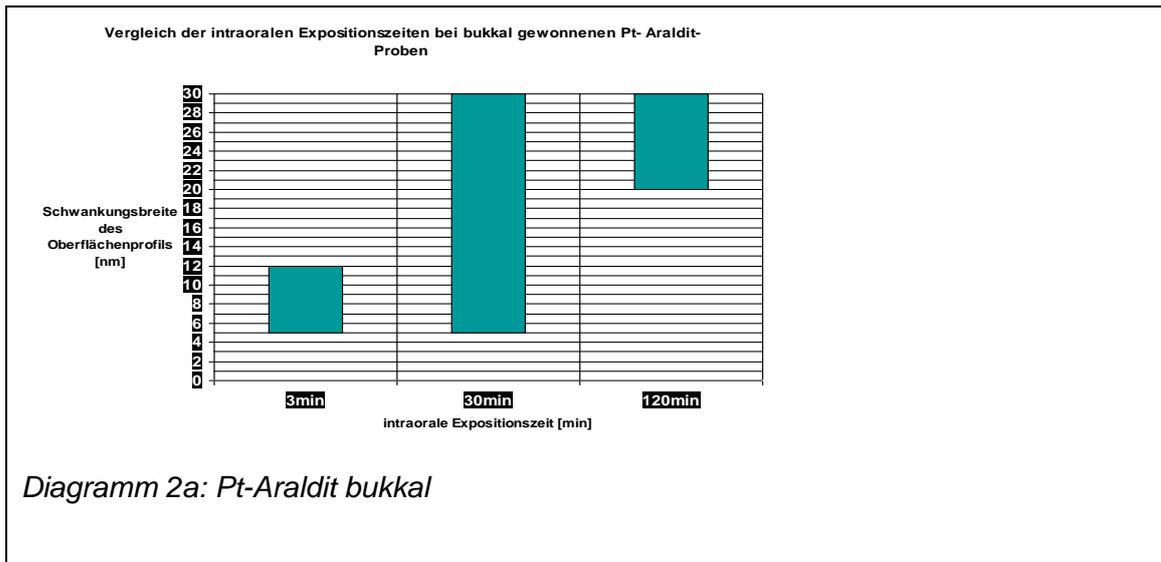
In Diagramm 2 wurde die Schwankungsbreite der Höhenprofile der bukkal und palatinal gewonnenen Pellikel nach den unterschiedlichen Expositionszeiten von 3 min, 30 min und 120 min aufgeführt.

Die bukkalen Pellikelproben zeigten mit steigender intraoraler Expositionszeit ein kontinuierlich ansteigendes Oberflächenhöhenprofil. Das Höhenprofil der Pellikel nahm mit steigender intraoraler Expositionszeit bei den Pt-Araldit-Proben bukkal von 5-12 nm nach 3 min, über 5-30 nm nach 30 min bis hin zu 20-30 nm nach 120 min, zu (Diagramm 2a).

In Diagramm 2c war bei den bukkal gebildeten Pellikeln auf Siliziumoxid-Wafer ein ähnliches Ergebnis zu sehen. Das Höhenprofil der Pellikel stieg von minimal 1,5-2,5 nm nach 3 min, über 5-6 nm nach 30 min bis zu 8-15 nm nach 120 min.

Die palatinal gebildeten Pellikel auf Pt-Araldit-Proben wiesen ein Maximum des mittleren Oberflächehöhenprofils von 8-12 nm nach 30-minütiger intraoraler Expositionszeit auf. Das Oberflächenprofil schien sich nach 120-minütiger Pellikelbildung wieder abzuflachen und betrug nur ca. 5-10 nm (Diagramm 2b).

Die palatinal gebildete Pellikel auf dem Siliziumoxid-Wafer blieb auch bei steigender intraoraler Expositionszeit ähnlich oder gleich mit einem mittleren Höhenprofil von ca. 2-3 nm (Diagramm 2d).



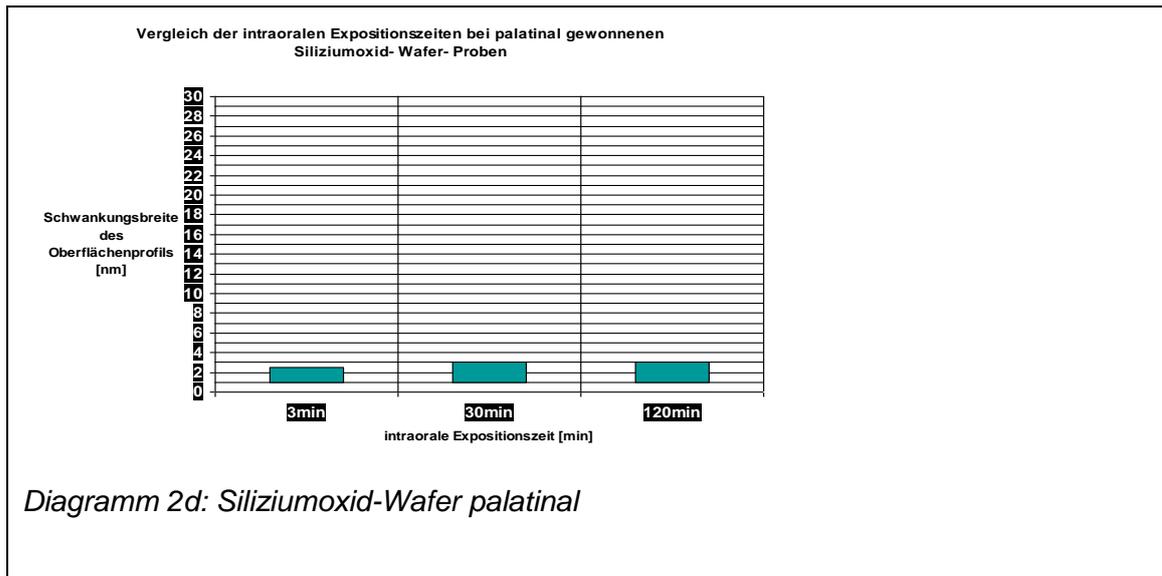


Diagramm 2: Vergleich des Oberflächenprofils der bukkal und palatinal gebildeten Pellikel auf Pt-Araldit und Siliziumoxid-Wafer nach den Expositionszeiten von 3 min, 30 min und 120 min.

4.1.5.3 Probandenvergleich

Gibt es Unterschiede zwischen den Probanden im Hinblick auf die Pellikelbildung?

Die untersuchten Pellikelproben auf Pt-Araldit und Siliziumoxid-Wafer wurden von vier verschiedenen Probanden (1- 4: KH, IK, HM, SGT) gewonnen. Es stellte sich die Frage nach der Vergleichbarkeit der Pellikel hinsichtlich der Pellikeloberflächenmorphologie oder auch der Pellikeldichte.

Die in Abbildung 10b und 10c aufgeführten AFM-Bilder einer 3-min-Pellikel auf Pt-Araldit in der Auflösung von $1 \times 1 \mu\text{m}$ wurden von zwei unterschiedlichen weiblichen Probanden 1 und 2 (KH, IK) gewonnen. Die Oberflächenmorphologie zeigte keine großen Unterschiede und die Proben ähnelten sich hinsichtlich der Pellikeldichte. Bei beiden Proben waren Löcher in der Pellikeloberfläche auszumachen, und die granuläre Struktur war bei beiden Pellikeln zu erkennen. Das mittlere Oberflächenhöhenprofil, das in Abbildung 10b bei Proband 1 (KH) bei ca. 10-15 nm und in Abbildung 10c bei Proband 2 (IK) nur bei etwa 5-8 nm lag, unterschied sich hingegen.

Auch die in Abbildung 11a und 11c gezeigten AFM-Bilder der bukkalen 30-min-Pellikel auf Pt-Araldit unterschieden sich hinsichtlich des mittleren Höhenprofils von nur ca. 5 nm in Abbildung 11c von Proband 2 (IK) und von um die 30

nm in Abbildung 11a von Proband 1 (KH). Die granulär-globulären Pellikelstrukturen waren jedoch ebenso wie immer noch auftretende vereinzelte Löcher (blau dargestellt) in beiden AFM-Bildern zu sehen.

Bei den nach 120 min bukkal gewonnenen Pellikeln auf Pt-Araldit war bei den Probanden in Abbildung 12a und 12c wiederum die Zunahme der granulären Strukturen in der Oberflächenmorphologie zu erkennen. Die beiden AFM-Darstellungen unterschieden sich bei Betrachtung des Oberflächenreliefs der Pellikel ebenfalls nicht stark. In Abbildung 12c, dem AFM-Bild der Pellikel von Proband 2 (IK), wurde allerdings eine Verunreinigung der Probe vor Aufnahme der Pellikel vermutet, da das mittlere Höhenprofil der Pellikel stark von den anderen in den AFM-Bildern variierte.

Betrachtete man die palatinal gebildeten Pellikel auf Pt-Araldit bei den verschiedenen Probanden, so zeigte sich nach 3-minütiger intraoraler Expositionszeit der Proben wiederum ein vergleichbares Oberflächenrelief bei den Probanden 1 und 2 (Abbildungen 13a und 13c). Eine fein-granuläre Oberfläche und noch vermehrt auftretende Löcher in der Pellikeldichte waren bei beiden sichtbar.

Nach 30-minütiger palatinaler intraoraler Expositionszeit der Substrate verschwanden diese Löcher in der Oberflächenmorphologie bei den verschiedenen Probanden (Abbildungen 14a und 14c). Die AFM-Bilder mit der Auflösung von $5 \times 5 \mu\text{m}$ zeigten wiederum im mittleren Höhenprofil der Pellikel Unterschiede.

Die Abbildungen 15a und 15b stellen Pellikel der Probanden 1 und 2 (KH und IK) nach einer intraoralen Expositionszeit von 120 min dar. Die feingranuläre Oberflächenstruktur war in beiden Darstellungen der Auflösung $5 \times 5 \mu\text{m}$ deutlich zu sehen. Beim Vergleich der Oberflächenmorphologie der Pellikel war auch hier kein eindeutiger Unterschied auszumachen.

Die optische Ähnlichkeit der AFM-Bilder der verschiedenen Probanden wurde auch in der Versuchsreihe zur Pellikelbildung auf dem Siliziumoxid-Wafer deutlich. Die Abbildungen 16a und 16c wurden mit verschiedenen Auflösungen aufgenommen. Die granulär-globuläre Oberflächenmorphologie der Pellikel war bei den bukkal gewonnenen 3-min-Pellikel der Probanden 3 (HM) und 4 (SGT) sichtbar. Der bei den Pt-Araldit-Proben aufgefallene Unterschied im mittleren Oberflächenhöhenprofil der Pellikel von verschiedenen Probanden war ebenfalls bei den Siliziumoxid-Proben nachzuvollziehen. In Abbildung 16a bei Pro-

band 3 (HM) lag das mittlere Oberflächenprofil der Pellikel bei ca. 2 nm und in Abbildung 16c bei Proband 4 (SGT) bei nur ca. 1 nm.

Die in den Abbildung 20a und 20c nach 30-minütiger intraoraler Expositionszeit palatinal gebildeten Pellikel auf Siliziumoxid-Wafer zeigten kleinere granuläre und größere globuläre Strukturen in beiden Darstellungen. In Abbildung 20c, dem AFM-Bild der Pellikel des Probanden 4 (SGT), waren noch einzelne Löcher und ein mittleres Höhenprofil der Pellikel von ca. 2,5-3 nm zu sehen. Im Unterschied dazu lag das Höhenprofil der Pellikel des Probanden 3 (HM) nur bei etwa 1,5-2 nm (Abbildung 20a).

4.1.5.4 Lokalisationsvergleich

Gibt es Unterschiede in der Oberflächenmorphologie der Pellikel abhängig von den unterschiedlichen intraoralen Lokalisationen?

Beim Vergleich der bukkalen Pellikelproben nach den unterschiedlichen Zeiteinheiten konnte man bei den Pt-Araldit-Proben und bei den Siliziumoxid-Wafer-Proben eine Zunahme des durchschnittlichen Oberflächenhöhenprofils der Pellikel mit steigender intraoraler Expositionszeit ausmachen. Palatinal blieb das mittlere Höhenprofil insgesamt gesehen dagegen bei steigender intraoraler Expositionszeit eher konstant.

Nach einer 3-minütigen intraoralen Exposition der Substrate waren die Unterschiede im Höhenprofil der Pellikel bukkal und palatinal noch nicht deutlich zu erkennen (Diagramm 3a).

Bei den Pt-Araldit-Proben war bukkal nach 3 min ein mittleres Oberflächenprofil der Pellikel von 5-12 nm und palatinal von 5-10 nm zu erkennen. Die Pellikel auf den Siliziumoxid-Wafer-Proben hatten nach 3 min ein ähnliches Höhenprofil von bukkal 1,5-2,5 nm und palatinal von 1-2,5 nm vorzuweisen.

Erst nach einer intraoralen Expositionszeit der Substrate von 30 min waren die unterschiedlichen Oberflächenrauheiten der Pellikel bukkal und palatinal deutlich zu sehen. Bei den in Diagramm 3b aufgeführten Daten lag die Schwankungsbreite des Höhenprofils der Pellikel auf Pt-Araldit-Proben bukkal bei 5-30 nm und palatinal nur bei 8-12 nm. Der Unterschied im Oberflächenprofil war bei den Pellikelproben auf Siliziumoxid-Wafer mit 5-6 nm bukkal und nur 1-3 nm palatinal ebenso zu sehen. Die Oberflächenkörnung der Pellikel wurde palatinal ab einer intaroralen Expositionszeit von 30 min mit der Zeit feiner als bukkal.

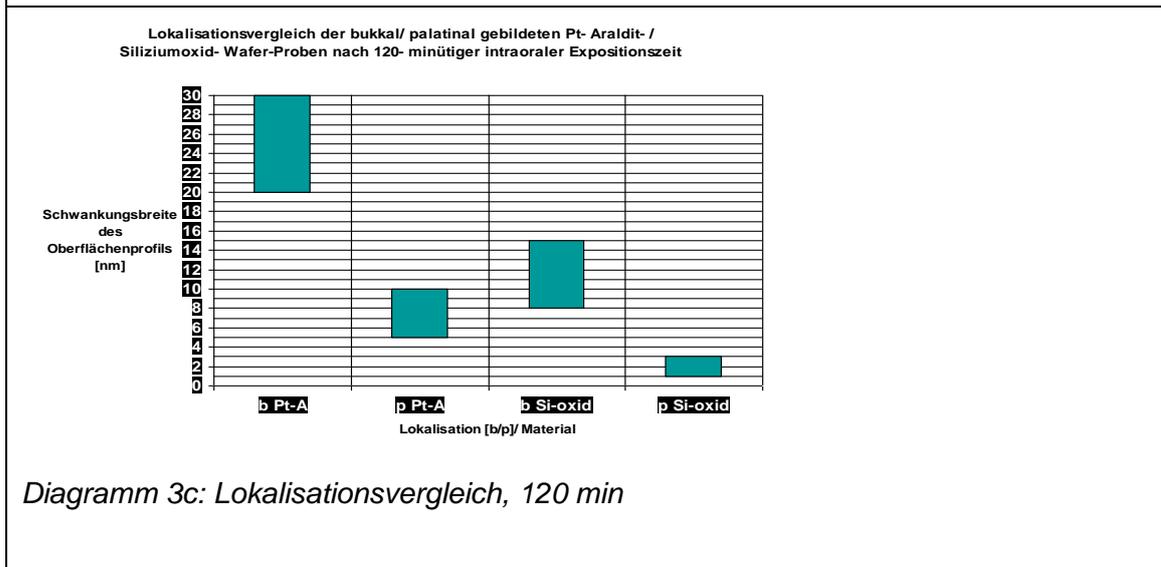
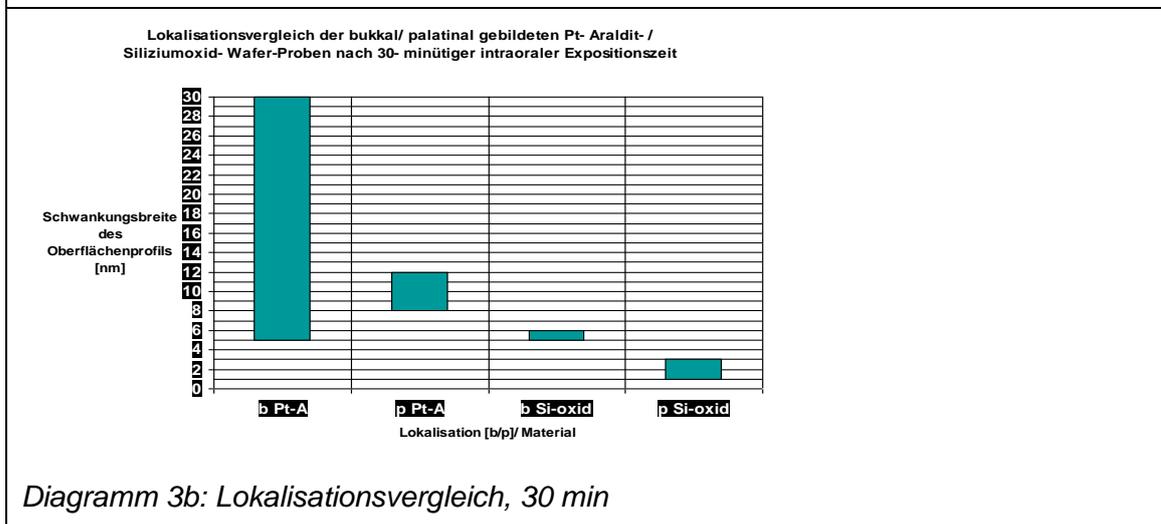
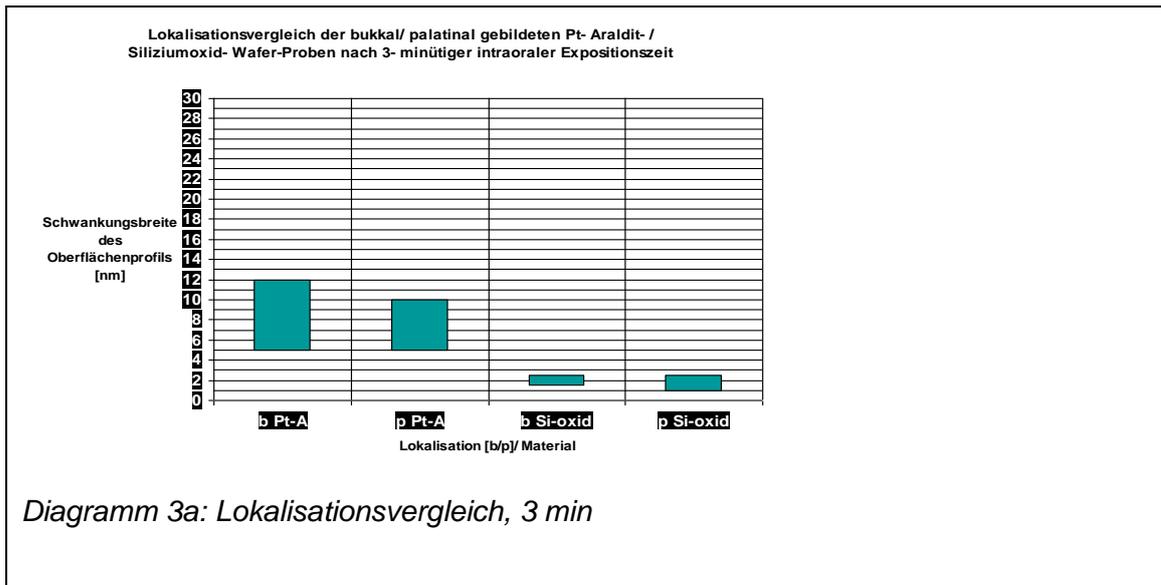


Diagramm 3: Lokalisationsvergleich von den bukkal und palatinal gewonnenen Pellikelpuben nach 3 min, 30 min und 120 min intraoraler Exposition.

Nach 120-minütiger intraoraler Expositionszeit zeigte sich ebenso ein sehr deutlicher Unterschied im mittleren Höhenprofil (Diagramm 3c). Die Pellikel der Pt-Araldit-Probe wies bukkal ein Höhenprofil von ca. 20-30 nm und palatinal von nur 5-10 nm auf. Die Pellikel der Siliziumoxid-Probe hatte bukkal einen Wert von 8-15nm im mittleren Höhenprofil und palatinal nur von 1-3 nm.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass bei den Proben beider Materialien ab einer intraoralen Expositionszeit von 30 min bukkal ein höheres mittleres Oberflächenhöhenprofil der Pellikel zu erkennen war als palatinal.

4.2 Ellipsometrische Analyse der Pellikelbildung auf verschiedenen Substraten

Für die ellipsometrische Analyse wurden zwei verschiedene Probenmaterialien gegenübergestellt. Es wurden Siliziumoxid-Wafer-Proben und OTS-Proben für 3 min, 30 min und 120 min intraoral an den oberen Molaren bei zwei Probanden angebracht. Nach der Pellikelbildung wurden die Proben ellipsometrisch analysiert und nach folgender Fragestellung ausgewertet:

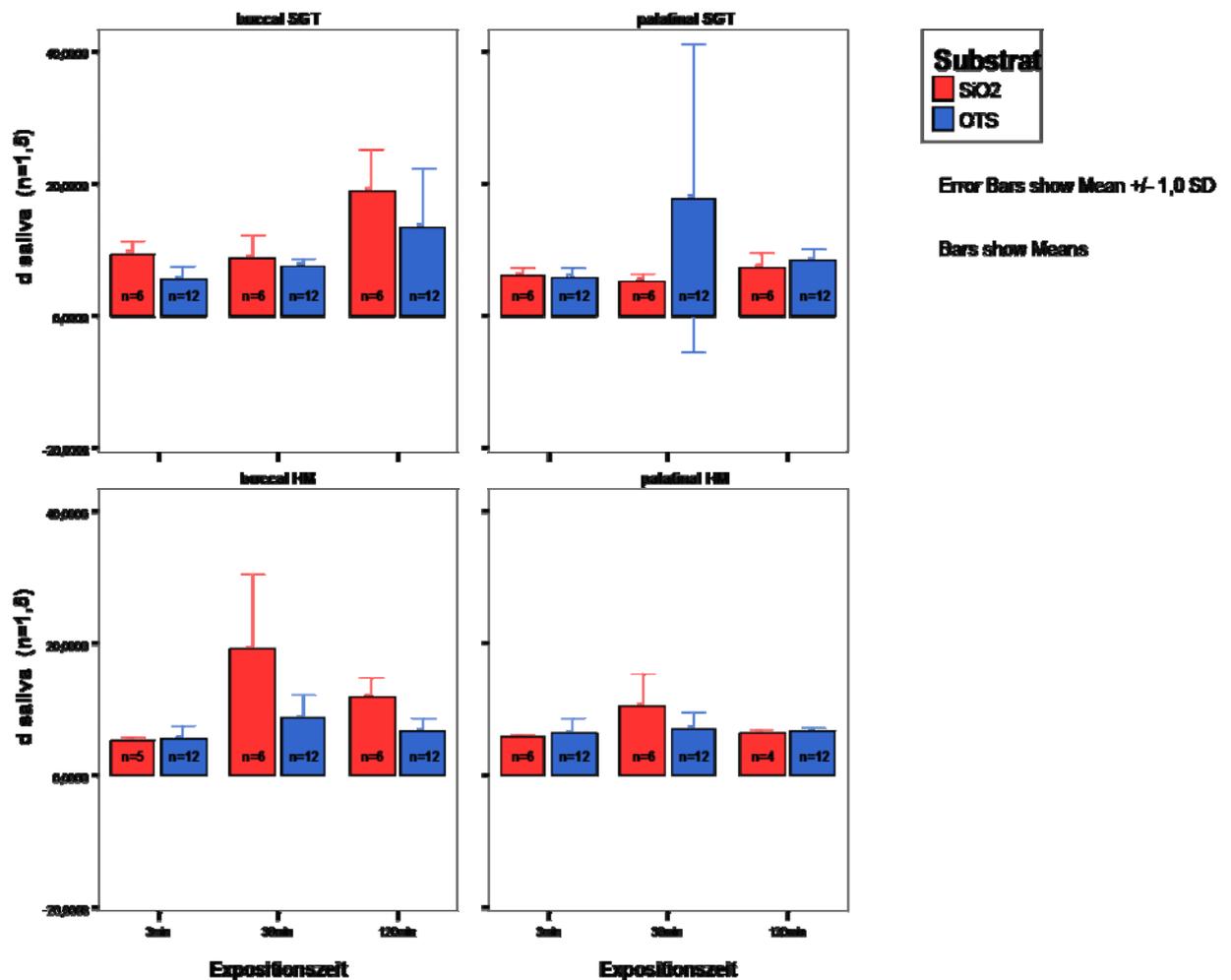
Gibt es einen Einfluss des Substrates auf die Pellikeldicke?

4.2.1 Vergleich Siliziumoxid-Wafer vs. OTS-beschichteter Siliziumoxid-Wafer (hydrophil vs. hydrophob)

Der reine Siliziumoxid-Wafer ist ein hydrophiles Material und wurde durch die Beschichtung mittels Oktadecyltrichlorsilan-Molekülen (OTS) hydrophobisiert. Es konnten somit zwei unterschiedliche Substrate (hydrophil, hydrophob) untersucht werden, die sich hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften unterscheiden.

Diagramm 4 gibt einen Überblick über die ellipsometrisch gemessenen Mittelwerte der Pellikelschichtdicken auf den verschiedenen Proben nach den drei Expositionszeiten.

Innerhalb der verschiedenen intraoralen Expositionszeiten wurden bei den beiden Probanden 3 und 4 (HM und SGT) jeweils mehrere Messungen zusammengefasst und der Mittelwert der Schichtdicken der Pellikel berechnet. Die Anzahl der ellipsometrisch analysierten Proben wurde innerhalb des Balkendiagramms in den Säulen aufgeführt und einen genaueren Überblick über die Anzahl der analysierten Pellikel zeigt die im Anhang aufgeführte Tabelle 3. Die beiden oberen Balkendiagramme zeigten die Ergebnisse der Messungen von Proband 4 (SGT) und die beiden unteren die des Probanden 3 (HM). Die folgenden Beispiele wurden aufgeführt um das Lesen des Diagramms exemplarisch aufzuzeigen. Bei Proband 4 (SGT) entsprach der Mittelwert der Pellikelschichtdicken auf den 6 bukkal getragenen Siliziumoxid-Wafer-Proben ($n=6$) nach einer 3-minütigen intraoralen Expositionszeit beispielweise 9,4 nm mit einer Standardabweichung von 1,8 nm.



d saliva= Schichtdicke der Pellikel

n= angenommene Brechungszahl des Speichels (n= 1,5)

n= Anzahl der Proben (n= 6/ n= 12)

Diagramm 4: Das Balkendiagramm gibt einen Überblick über die ellipsometrisch gemessenen Mittelwerte der Pellikelschichtdicken auf Siliziumoxid und OTS nach drei unterschiedlichen intraoralen Expositionszeiten der Substrate.

Der entsprechende Wert der Pellikelschichtdicke auf den OTS-Proben (n= 12) betrug 5,4 nm mit einer Standardabweichung von 2,3 nm. Nach einer 30-minütigen intraoralen Expositionszeit wurde bei Proband 4 (SGT) auf Siliziumoxid-Wafer ein Mittelwert der Schichtdicke der bukkalen Pellikel von 8,8 nm mit einer Standardabweichung von 3,4 nm gemessen und auf OTS ein Mittelwert der bukkalen Pellikeldicke von 7,6 nm mit einer Standardabweichung von 0,9 nm.

Die Übersichtstabellen mit allen Mittelwerten der ellipsometrisch analysierten Pellikelschichtdicken wurden im Anhang aufgeführt (Tabelle 4, Tabelle 5).

Tabelle 2 zeigt die statistische Analyse der gemessenen Mittelwerte, da sich die Frage nach dem Einfluss des Substrates auf die Pellikeldicke stellte.

Tabelle 2: Diese Tabelle zeigt die statistische Analyse (ANOVA) (p-Werte) der ellipsometrisch analysierten Mittelwerte der Pellikelschichtdicken bei Proband 3 und 4 (HM und SGT). Fett markiert sind signifikante Unterschiede für $p < 0,05$.

d (n=1,5)

Expositionszeit	Proband	Lokalisation	p-Werte
3min	SGT	bukkal	,002
		palatinal	,693
	HM	bukkal	,852
		palatinal	,652
30min	SGT	bukkal	,290
		palatinal	,209
	HM	bukkal	,009
		palatinal	,081
120min	SGT	bukkal	,214
		palatinal	,161
	HM	bukkal	,000
		palatinal	,829

Betrachtete man die zu den signifikanten p-Werten (fett markiert) passenden Mittelwerte (aufgeführt in Tabelle 4 im Anhang), so wurde bei Proband 4 (SGT) nach einer 3-minütigen Pellikelbildungszeit auf reinem Siliziumoxid eine gemittelte Pellikelschicht von 9,4 nm und von ca. 5,4 nm auf einem OTS-beschichteten Siliziumoxid-Wafer gemessen. Die Proben des Probanden 3 (HM) ergaben bei der ellipsometrischen Analyse nach 30-minütiger Pellikelbildungszeit eine Pellikelschichtdicke von 19,1 nm auf Siliziumoxid-Wafer und von 8,8 nm auf OTS sowie nach 120-minütiger Pellikelbildungszeit eine Pellikeldicke von ca. 11,8 nm auf Siliziumoxid und von 6,6 nm auf OTS.

Insgesamt lagen die ellipsometrisch analysierten Mittelwerte der Pellikelschichtdicken auf Siliziumoxid über denen von OTS.

Anhand der statistischen Auswertung der ellipsometrisch ermittelten Pellikeldicken auf den hydrophilen Siliziumoxid-Wafer-Proben und den durch eine OTS-Beschichtung hydrophobisierten Proben konnte man im Einzelfall nach allen drei intraoralen Expositionszeiten einen signifikanten Einfluss des Probenmaterials bezüglich der Pellikelschichtdicke feststellen, wie in Tabelle 2 deutlich wurde. Insgesamt schied sich auf dem OTS-Substrat weniger Pellikel als auf dem reinen Siliziumoxid-Substrat ab (siehe Tabelle 4 im Anhang).

4.3 Methodenvergleich AFM, Ellipsometer und TEM

Zur Analyse der Biofilmadsorption an Oberflächen wurde ein Methodenvergleich der Ellipsometrie, Rasterkraftmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie durchgeführt. Es wurden Pt-Araldit-Proben betrachtet, die von den Probanden 1 und 2 (KH und IK) für 30 min intraoral an den oberen Molaren zur Pellikelbildung getragen wurden. Die entstandenen Pellikel wurden mit den drei unterschiedlichen Methoden untersucht. Die folgenden Abbildungen stellen die AFM- und TEM-Bilder sowie die ermittelten Ellipsometriedaten einander gegenüber.

Eine Übersichtstabelle zu den ellipsometrisch analysierten Pellikelschichtdicken wurde im Anhang aufgeführt (Tabelle 6). Es wurde pro analysierter Probe ein Mittelwert der Schichtdicke der Pellikel mit Standardabweichung angegeben.

Die AFM-Bilder sind im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit schon beschrieben worden und wurden hier zur Gegenüberstellung der Methoden wieder herangezogen.

4.3.1 Methodenvergleich am Beispiel der bukkalen 30-min-Pellikel der Probandin KH

In Abbildung 22a zeigte die Pellikel im AFM-Bild eine hohe Variation im Höhenprofil der Oberfläche von 0-50 nm. Die Oberflächenmorphologie der Pellikel zeichnete sich durch eine globuläre Struktur aus mit maximalen Durchmessern der größeren Globuli von bis zu 120 nm. Die Pellikeloberfläche erschien in diesem Bild relativ homogen. Die globulären Strukturen waren gleichmäßig in den verschiedenen Lagen des Höhenprofils verteilt.

Die TEM-Darstellung (Abbildung 22b) zeigte eine heterogene, teils globuläre Pellikelform mit vereinzelt dunkleren Bereichen, die durch eine vermehrte Elektronendichte der Pellikel an diesen Stellen bedingt waren. Die globulär-granulären Strukturen hatten einen Durchmesser von ungefähr 30-80 nm und die aus den Bildern abgelesene Schichtdicke der Pellikel reichte von ca.10-75 nm. Die Unterscheidung der Platinbesputterung, die sich als schwarze unregelmäßige Schicht darstellte, von der elektronendichteren Basisschicht der Pellikel war in diesem Bild (Abbildung 22b) nicht möglich.

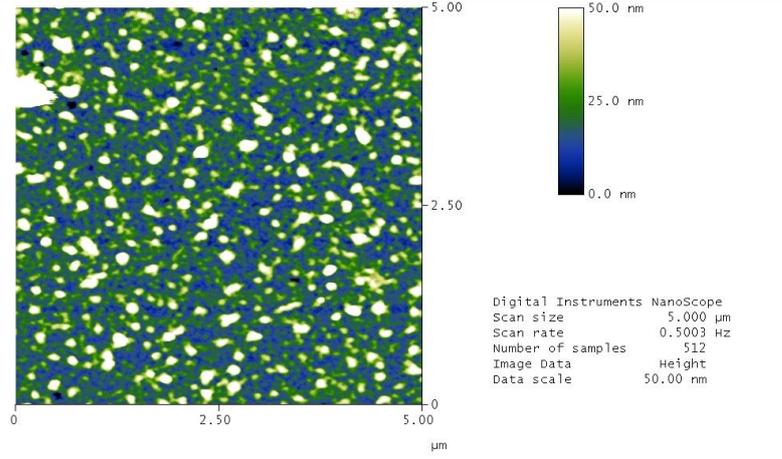
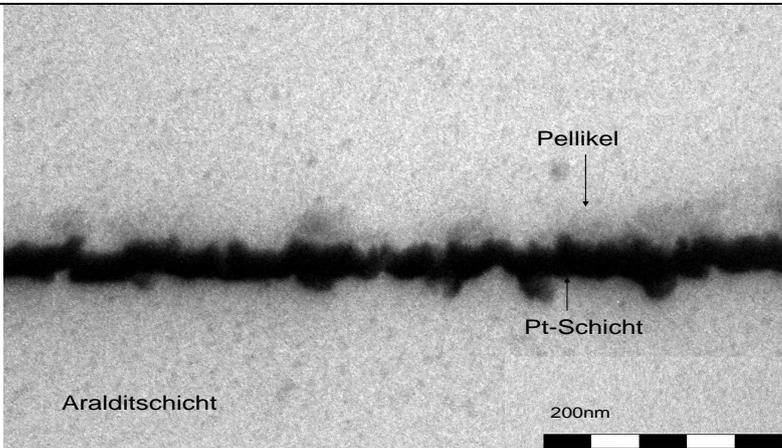
 <p>Abb. 22a: AFM-Bild, 5x5 μm</p>	<p>In Abbildung 22a sind globuläre Strukturen auf der Oberfläche der Pellikel mit einer Variation des Höhenprofils von 0-50 nm zu erkennen. Die Globuli haben Durchmesser von ca. 120 nm.</p>
 <p>Abb. 22b: TEM-Bild, 200 nm</p>	<p>Das TEM-Bild zeigt vereinzelte globuläre Strukturen, die sich elektroendichter präsentieren, mit Durchmessern der Globuli von ca. 30-80 nm. Die Schichtdicke der Pellikel beträgt ca. 10-75 nm, wobei die Basischicht der Pellikel nicht gut von der Pt-Schicht der Probe abzugrenzen ist.</p>
<p>Ellipsometriedaten: Schichtdicke: 17,71 nm +/- 0,770 nm Adsorbierte Menge: $\Gamma = 48,38 \text{ mg/m}^2$</p>	

Abbildung 22: Überblick über die Auswertung der bukkal gewonnenen Pellikelproben der Probandin KH nach 30-minütiger intraoraler Expositionszeit mit den drei verschiedenen Verfahren (AFM, TEM, Ellipsometrie).

Die Ellipsometriemessung an der pellikelbedeckten Pt-Araldit-Probe ergab eine gemittelte Schichtdicke der Pellikel von 17,71 +/- 0,770 nm. Die Umrechnung der Schichtdicke in die durchschnittlich adsorbierte Pellikelmenge auf diesem gemessenen Probenstück ergab einen Wert von $\Gamma = 48,38 \text{ mg/m}^2$. Im direkten Vergleich der ellipsometrisch analysierten durchschnittlichen Schichtdicke der Pellikel von ca. 17 nm mit den Ergebnissen der TEM-Darstellung, die eine unregelmäßige Schichtdicke von 10-75 nm erkennen ließ, würde die alleinige Information mittels des Ellipsometers eine recht geringe Schichtdicke generell vermuten lassen. Das TEM-Bild zeigte recht deutlich die Variation der Pellikel im Oberflächenrelief, welches mittels der AFM-Darstellung ebenso demonstriert wurde. Die Betrachtung der Höhenskala der Pellikel im AFM-Bild lieferte jedoch nur Auskunft über die Oberflächenbeschaffenheit, nicht über die gesamte Schichtdicke der Pellikel.

4.3.2 Methodenvergleich am Beispiel der palatinalen 30-min-Pelikel der Probandin KH

Im AFM-Bild der Abbildung 23a ergab das mittlere Höhenprofil der palatinalen 30-min-Pelikel einen Wert von ca. 12 nm. Es waren hier globuläre Strukturen mit einem mittleren Höhenprofil von ca. 15 nm zu sehen. Die granulären Strukturen in der Oberflächenmorphologie der Pellikel waren insgesamt relativ fein verteilt.

In der TEM-Darstellung der Pellikel in den Abbildung 23b und 23c waren globuläre Pellikelstrukturen mit Durchmessern von maximal bis ca. 80 nm und auch flächigere, aufgelockerte Pellikelanteile mit Durchmessern von bis zu max. 110 nm zu erkennen. Es waren der elektronendichten globulären Schicht feingranuläre Schichten aufgelagert. In den TEM-Bildern war die Schichtdicke der Pellikel mit ca. 10-60 nm in den verschiedenen Bereichen recht unregelmäßig. Die Pellikel stellte sich insgesamt als eine sehr heterogene Struktur in der TEM-Betrachtung dar.

Die durchschnittlich gemessene Schichtdicke der Pellikel mittels des Ellipsometers lieferte in diesem Fall einen gemittelten Wert von 6,98 +/- 0,479 nm. Die Heterogenität der Pellikel im Höhenprofil wurde in den ellipsometrischen Messungen nicht erfasst. Die adsorbierte Gesamtmenge an Pellikel nach Umrechnung der gemessenen Schichtdicke ergab einen Wert von $\Gamma = 19,07 \text{ mg/m}^2$.

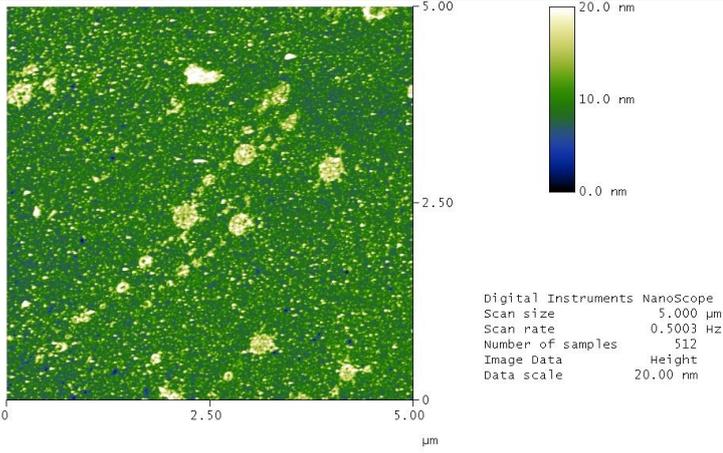
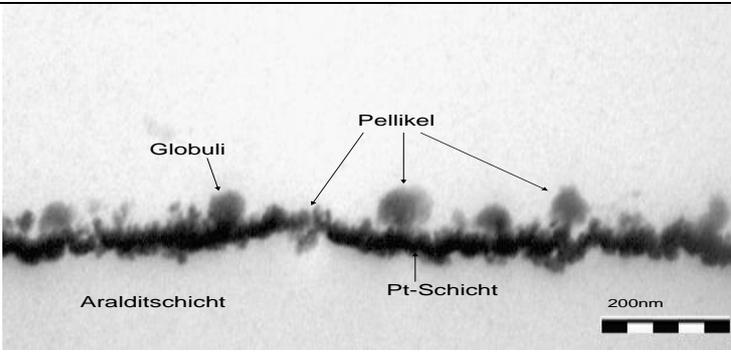
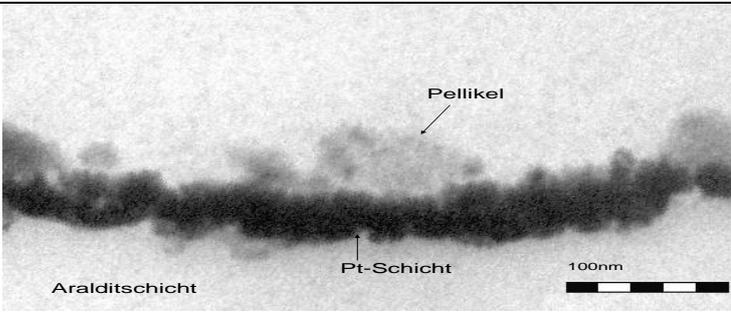
 <p>Abb. 23a: AFM-Bild, 5x5 μm</p>	<p>Abbildung 23a zeigt eine relativ homogene Pellikeloberfläche mit feiner Körnung und einem mittleren Höhenprofil von ca. 12 nm. Peaks bis zu einer Höhe von 15-20 nm mit einem flächenhaften Durchmesser von ca. 214 nm sind eventuell von Verunreinigungen der Probe verursacht.</p>
 <p>Abb. 23b: TEM-Bild, 200 nm</p>	<p>In den TEM-Bildern ist eine heterogene Struktur der Pellikel zu erkennen. Die Schichtdicken reichen von 10 nm bis zu 60 nm. Die globulären Strukturen haben Durchmesser von maximal ca. 80 nm und auch flächigere Pellikelanordnungen von ca. 110 nm im Durchschnitt sind zu erkennen. Den elektronendichter erscheinenden Globuli sind feinglobulärere Schichten aufgelagert.</p>
 <p>Abb. 23c: TEM-Bild, 100 nm</p>	
<p>Ellipsometriedaten: Schichtdicke: 6,98 nm +/- 0,479 nm Adsorbierte Menge: $\Gamma = 19,07 \text{ mg/m}^2$</p>	

Abbildung 23: Überblick über die Auswertung der palatinal gewonnenen Pellikelproben der Probandin KH nach 30-minütiger intraoraler Expositionszeit mit den drei verschiedenen Verfahren (AFM, TEM, Ellipsometrie).

4.3.3 Methodenvergleich am Beispiel der bukkalen 30-min-Pellikel der Probandin IK

Die Oberfläche der Pellikel (Abbildung 24a) nach 30-minütiger intraoraler Expositionszeit wies in der AFM-Darstellung noch einige Löcher auf. Die flächigeren Peakbereiche waren wahrscheinlich auf Verunreinigungen der Probe vor der Pellikelbildung zurückzuführen, da sie nicht die typischen globulären Strukturen aufwiesen. Im mittleren Höhenprofil zeigten sich Peaks bis ca. 8 nm mit Durchmessern der Globuli von ca. 64 nm. Insgesamt befand sich das Oberflächenhöhenrelief der Pellikel in einem Bereich von 0-10 nm.

In den TEM-Bildern (Abbildungen 24b und 24c) wurde ein heterogenes, globulär-granuläres Erscheinungsbild der Pellikel mit elektronendichteren runden Bereichen mit mittleren Durchmessern der Globuli von ca. 50 nm sichtbar. Der elektronendichten Schicht waren feingranuläre Pellikelschichten aufgelagert, wobei die Durchmesser der Granula ca. 10 nm betragen. Die Schichtdicke der Pellikel war sehr variabel und wies Werte zwischen 10-300 nm auf. In Abbildung 24c konnte die Heterogenität der Pellikelstruktur, die variable Oberflächenmorphologie und die variable Schichtdicke gut aufgezeigt werden.

Die ermittelten Ellipsometriedaten der Pellikel ergaben eine mittlere Schichtdicke von $7,08 \pm 0,478$ nm, sowie eine umgerechnete adsorbierte Pellikelmenge von $\Gamma = 19,34$ mg/m². Die analysierten Ellipsometriedaten lieferten im Vergleich zu den abgelesenen Werten aus den AFM- und TEM-Bildern eine recht dünne Pellikelschicht.

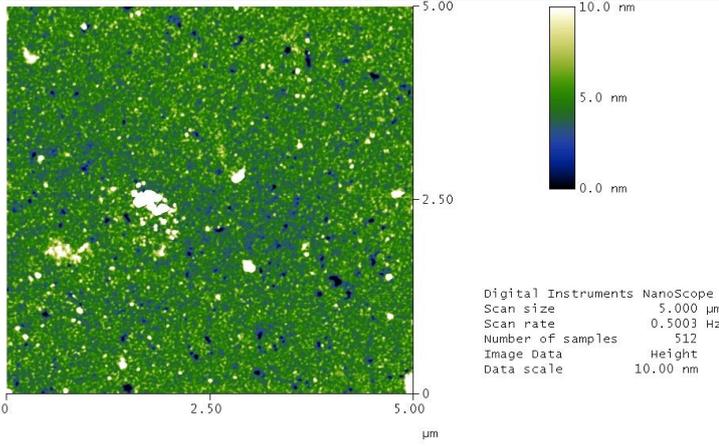
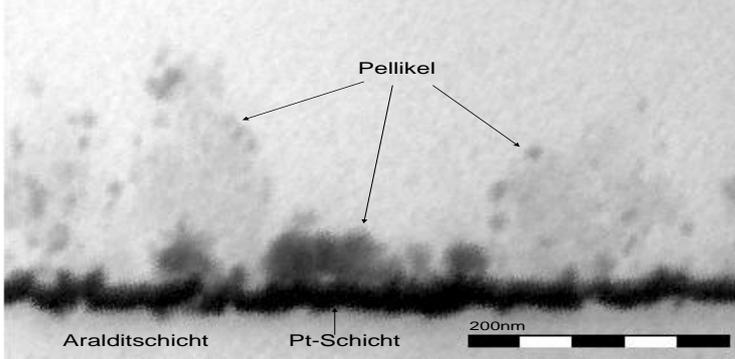
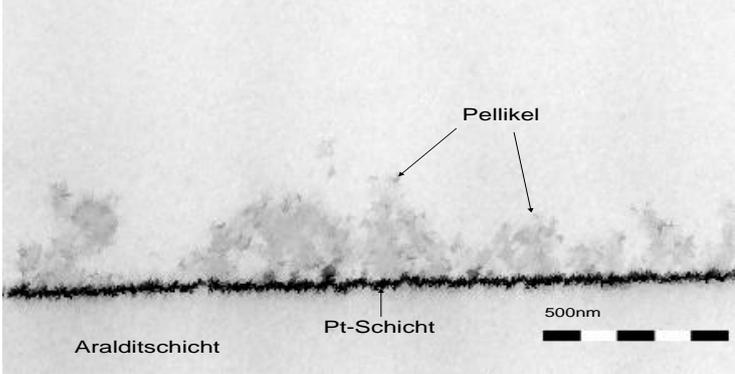
 <p>Abb. 24a: AFM-Bild, 5x5 μm</p>	<p>Das Bild zeigt eine insgesamt dünnere Pellikelschicht von ca. 0-10 nm und noch flächig verteilte Löcher in der Pellikeloberfläche. Es sind Granula im mittleren Höhenprofil von ca. 8 nm mit mittleren Durchmessern von ca. 64 nm zu erkennen.</p>
 <p>Abb. 24b: TEM-Bild, 200 nm</p>	<p>Im TEM-Bild weist die Pellikel ein heterogenes globulär-granuläres Erscheinungsbild auf, mit mittleren Durchmessern der globulären elektronendichteren Bereiche von ca. 50 nm. Die Schichtdicken sind sehr variabel zwischen 10-300 nm und die aufgelagerten feingranulären Pellikelschichten haben Granuladurchmesser von ca. 10 nm. Es gibt wenig homogene Bereiche.</p>
 <p>Abb. 24c: TEM-Bild, 500 nm</p>	
<p>Ellipsometriedaten: Schichtdicke: 7,08 nm +/- 0,478 nm Adsorbierte Menge: $\Gamma = 19,34 \text{ mg/m}^2$</p>	

Abbildung 24: Überblick über die Auswertung der bukkal gewonnenen Pellikelproben der Probandin IK nach 30-minütiger intraoraler Expositionszeit mit den drei verschiedenen Verfahren (AFM, TEM, Ellipsometrie).

4.3.4 Methodenvergleich am Beispiel der palatinalen 30-min-Pellikel der Probandin IK

Die AFM-Darstellung in Abbildung 25a zeigte flächig verteilte granuläre Strukturen im mittleren Höhenprofil von ca. 8 nm. Die globulären Strukturen hatten mittlere Durchmesser von ca. 92 nm. Einzelne flächigere Peakbereiche wiesen maximal bis zu 10 nm im Höhenprofil auf. Es waren vereinzelt Löcher in der Oberfläche der Pellikel zu erkennen. Die Oberflächenstruktur der Pellikel erschien insgesamt als homogenes Bild.

Die TEM-Darstellungen (Abbildungen 25b und 25c) zeigten ein durchgängig globuläres und elektronendichtes Erscheinungsbild der Pellikel. Der im TEM-Bild sehr dunkel wirkenden Pellikelschicht fehlten in dieser Darstellung die feingranulären Auflagerungen, die in den TEM-Bildern der Abbildungen 23 und 24 zu sehen waren. Die globulären Anteile hatten Durchmesser von ca. 20-30 nm und die Schichtdicke der Pellikel bewegte sich zwischen 10 und 30 nm. In Abbildung 25c gab es vereinzelte Bereiche mit sehr geringer Pellikelbildung, die eventuell aufgrund von Unebenheiten in der Pt-Besputterung der Probe verursacht waren.

Der gemessene Ellipsometriewert der Pellikelschichtdicke bewegte sich bei dieser Pellikel im Bereich von $5,72 \pm 0,477$ nm und passte bei Betrachtung der Größenordnungen gut zu den Werten der AFM- und TEM-Analysen.

Als umgerechnete adsorbierte Menge an Pellikel wurde auf der Probe ein Wert von $\Gamma = 15,62$ mg/m² ermittelt.

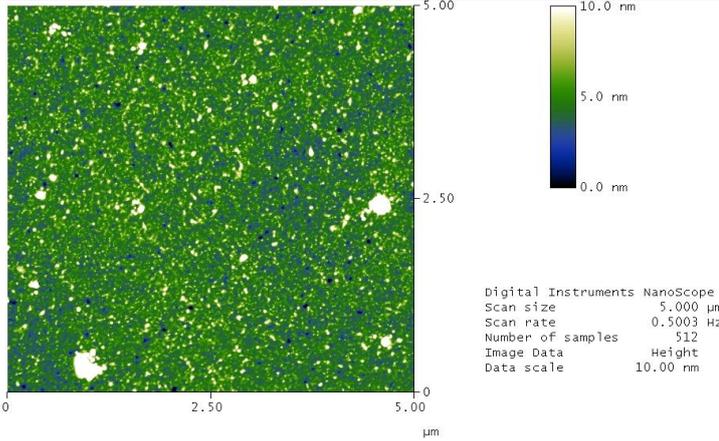
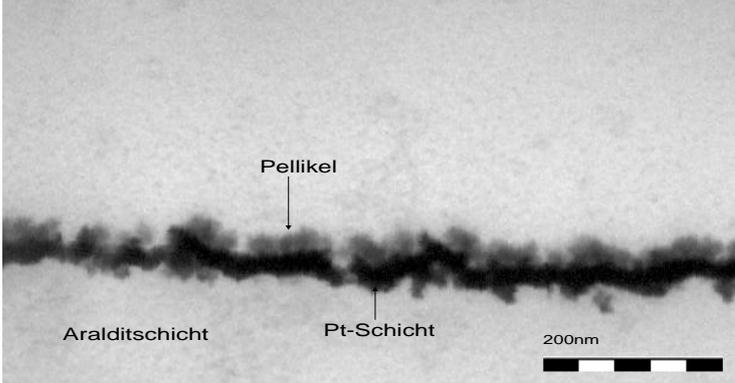
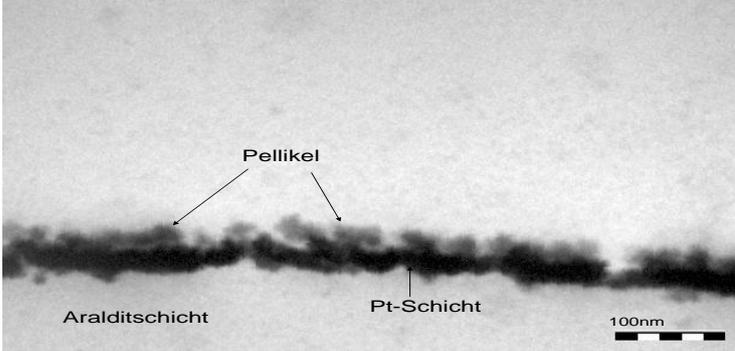
 <p>Abb. 25a: AFM-Bild, 5x5 μm</p>	<p>Abbildung 25a zeigt einige Löcher in der Pelliceloberfläche und granuläre Strukturen mit mittleren Durchmessern der größeren Globuli von ca. 92 nm. Das mittlere Höhenprofil der Globuli liegt bei ca. 8 nm und weist eine homogene Verteilung auf.</p>
 <p>Abb. 25b: TEM-Bild, 200 nm</p>	<p>Die Pellicel hat im TEM-Bild ein homogenes, durchgängig globuläres Erscheinungsbild mit wenigen Bereichen unterschiedlicher Elektronendichte. Feinere aufgelagerte granuläre Bereiche sind hier nicht zu erkennen. Die Globuli haben Durchmesser von ca. 20-30 nm und die Schichtdicke der Pellicel beträgt ca. 10-30 nm.</p>
 <p>Abb. 25c: TEM-Bild, 100 nm</p>	
<p>Ellipsometriedaten: Schichtdicke: 5,72 nm +/- 0,477 nm Adsorbierte Menge: $\Gamma = 15,62 \text{ mg/m}^2$</p>	

Abbildung 25: Überblick über die Auswertung der palatinal gewonnenen Pellicelproben der Probandin IK nach 30-minütiger intraoraler Expositionszeit mit den drei verschiedenen Verfahren (AFM, TEM, Ellipsometrie).

5 DISKUSSION

5.1 Diskussion von Material und Methoden

5.1.1 Herstellung der Prüfkörper

Die Auswahl der untersuchten Prüfkörpermaterialien richtete sich in dieser Studie zum einen nach der Oberflächenrauheit des Materials und zum anderen nach den physikalischen Oberflächeneigenschaften. Der vorproduzierte Siliziumoxid-Wafer eignete sich mit seiner atomar glatten Oberfläche und vergleichbar geringem Rauheitswert von unter 0,2 nm (Mantz 2008) sehr gut, um rasterkraftmikroskopische und ellipsometrische Untersuchungen durchführen zu können. Dieser Siliziumoxid-Wafer wurde auch als Grundlage zur Herstellung des zweiten Materials, des Pt-Araldits, genutzt, um eine ähnlich glatte Oberfläche zu erzielen. Platin gehört zur Gruppe der hydrophilen Metalle und wurde als zweiter hydrophiler Werkstoff neben dem Siliziumoxid in die Experimente mit rasterkraftmikroskopischen Analysen involviert.

Bei den ellipsometrischen Messungen war eine geringe Oberflächenrauheit der Substrate unverzichtbar, da zu raue Oberflächen zu verfälschenden Reflexionen in der Messung führten und somit als Substrat zur Auswertung mit dem Ellipsometer ungeeignet waren. Die Beschichtung des atomar glatten Siliziumoxid-Wafers, der mit einem Wasserkontaktwinkel von unter 10° einen hydrophilen Charakter zeigt, mit Oktadecyltrichlorsilan (OTS) diente in dieser Studie ausschließlich zur Hydrophobisierung der Oberfläche, um den Unterschied der Pellikelbildung auf hydrophilen und hydrophoben Materialien zu untersuchen.

Damit ergaben sich drei verschiedene Substrate, die für alle verwendeten Messmethoden geeignet waren. Die Oberflächen aller Prüfkörper wurden darüber hinaus einer einheitlichen Bearbeitung unterzogen, um die Auswirkungen materialspezifischer Parameter auf die Pellikelbildung untersuchen zu können. Die Reinigungsprozedur vor Aufnahme der Pellikel vollzog sich bei allen Proben gleich und beschränkte sich auf die chemische Reinigung, da nach einer Studie von Hannig M. und Bößmann (1987) eine mechanisch-abrasive Reinigung mit

Bürstchen zu einer Alteration des Mikroreliefs der Prüfkörperoberfläche führen kann.

5.1.2 Die In-situ-Pellikelbildung

Die milieubedingten Einflussfaktoren auf die Pellikelbildung wurden auf ein Minimum beschränkt, um die intraoralen Versuchsbedingungen so konstant wie möglich zu halten. Die Lokalisation der Prüfkörper beschränkte sich intraoral auf die Region der ersten oberen Molaren.

Die stärkste Pellikelbildung wird an oberen Molaren und Prämolaren sowie an den unteren Frontzähnen beobachtet und die Rate des Pellikelwachstums auf den einzelnen Zähnen innerhalb der Zahnreihe unterliegt ausgeprägten regionalen Unterschieden (Quirynen und van Steenberghe 1998). Durch Einschränkung der Lokalisationen der Proben im Mund konnte der Einfluss lokaldisponierender Faktoren wie Speichelfluß oder Speichelzusammensetzung eingeschränkt und materialspezifische Unterschiede in den Vordergrund gestellt werden.

Die Verwendung von Miniplastschienen stellte ein nicht invasives reproduzierbares Verfahren zur intraoralen Exposition von Prüfkörpern dar. Während der Expositionsversuche herrschte absolute Nahrungskarenz, um ernährungsbedingte Einflüsse auf die Pellikelbildung auszuschließen, da adsorbierbare Bestandteile aus der Nahrung zu Veränderungen in der Pellikelmorphologie führen können (van der Mei et al. 2002).

5.1.3 Fixierung und Vorbereitung zur Messung

Nach der Entnahme aus der Mundhöhle wurden die Proben vorsichtig mit Millipore-Wasser abgespült und danach in einer Glutaraldehyd-Lösung fixiert. Eine Prüfung der Pellikelschichtdicke mittels des Ellipometers vor und nach der Fixation der Pellikel zeigte keine nennenswerten Unterschiede. Die genauere Darstellung zum Einfluss der Fixation auf die ellipsometrisch messbare Pellikeldicke wird in der Dissertation von Sabine Güth-Thiel beschrieben.

Es folgte eine anschließende Trocknung der Proben. Da ca. 85% der Pellikel aus Wasser besteht, stellte sich die Frage nach der mikromorphologischen Veränderung der Pellikel nach der Trocknung. Eine Studie von Rudee und Price (1985) zeigte, dass eine kompakte und homogene Proteinschicht mit einer Dicke von wenigen Nanometern durch eine Lufttrocknung nicht alteriert wird.

Bei der Vorbereitung der Proben zur TEM-Messung bereiteten die Einbettbarkeit sowie die Schneidbarkeit der Prüfkörper methodische Probleme. Biochemische Analysen der adsorbierten Pellikel zeigten, dass ein Teil der Pellikelproteine säurelöslich ist und beispielsweise durch Salzlösungen mobilisiert werden kann (Mayhall 1975). Inwiefern die Löslichkeit von nativem Pellikelmateriale, das für biochemische Analysen verwendet wurde, mit den hier verwendeten und schon vorfixierten und eingebetteten Pellikelproben verglichen werden kann, ist allerdings fraglich.

Die Proteindenaturierung während der Fixierung sowie die Einbettung der organischen Pellikelbestandteile in Araldit dürfte zu einer Reduktion der Säurelöslichkeit geführt haben, so dass eine Beeinflussung der Pellikelmorphologie sehr unwahrscheinlich war.

Die Pt-Schicht der Probe stellte Schwierigkeiten beim Schneiden des Substrates dar. Bei genauer Betrachtung der angefertigten TEM-Bilder waren Unebenheiten in der Pt-Schicht auszumachen. Es stellte sich jedoch die Frage, ob diese Unebenheiten bei der Besputterung der Araldit-Schicht mit Platin aufgetreten sind oder ob die Risse erst beim Schneiden der Proben entstanden sind. Die Frage ließ sich final nicht hinreichend klären.

5.2 Diskussion der AFM-Studie zur Pellikelmorphologie

5.2.1 Diskussion der Ergebnisse des Substratvergleichs

Gibt es Unterschiede in der Oberflächenmorphologie der Pellikel auf Platin-Araldit- und Siliziumoxid-Wafer-Proben?

Die mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops (AFM) analysierten Pellikel auf den Probenkörpern aus Pt-Araldit und Siliziumoxid-Wafer zeigten bei Betrachtung der AFM-Bilder keine erkennbaren Unterschiede. Die globuläre und nach längerer intraoraler Expositionszeit der Substrate eher feingranuläre Oberfläche der Pellikel war bei beiden Materialien zu sehen. Das Auftreten von einzelnen Löchern in der Pellikeloberfläche war ebenso bei allen untersuchten Proben vor allem nach 3 min und 30 min zu beobachten.

Der Vergleich der Durchmesser einzelner globulärer Strukturen innerhalb des Oberflächenreliefs der Pellikel auf Pt-Araldit- und Siliziumoxid-Wafer-Proben zeigte beispielsweise ähnliche maximale Durchmesser der Globuli von ca. 17 nm nach bukkaler 3-minütiger intraoraler Expositionszeit (aus Abbildungen 10c und 16a). Auch nach 120-minütiger palatinaler intraoraler Expositionszeit waren ähnliche maximale Durchmesser der Globuli von 17-51 nm auf Siliziumoxid und von ca. 8-32 nm auf Pt-Araldit (aus Abbildungen 21b, 21c und 14b) zu erkennen.

Es stellten sich jedoch ebenso Unterschiede in der mikromorphologischen Struktur der Pellikel bei Vergleich verschiedener AFM-Bilder dar. Nach 30-minütiger bukkaler Expositionszeit hatten die globulären Proteinaggregate auf Pt-Araldit im mittleren Höhenprofil einen Durchmesser von ca. 135 nm und bei den Siliziumoxid-Proben konnten nur geringere Durchmesser der globulären Strukturen im mittleren Höhenprofil von 12-17 nm beobachtet werden (aus Abbildungen 11b, 17a und 17b).

Nach 3-minütiger palatinaler intraoraler Lokalisation der Proben konnten auf Pt-Araldit nur geringe Durchmesser der Globuli von ca. 2 nm gemessen werden, wohingegen sich auf Siliziumoxid-Proben größere Globuli mit ca. 21-26 nm im Durchmesser zeigten (aus Abbildungen 13b, 19a und 19b).

Beim Vergleich der mikromorphologischen Struktur der Pellikel auf den beiden Substraten ließ sich bei Begutachtung der Durchmesser der globulären Strukturen kein eindeutiger Unterschied ausmachen, da einmal die Durchmesser der Proteinaggregate sich ähnelten, einmal größere Strukturen auf Pt-Araldit und einmal größere Strukturen auf Siliziumoxid zu sehen waren ohne dass eine Beeinflussung der Pellikelbildung von der intraoralen Lokalisation oder von den unterschiedlichen Expositionszeiten beobachtet werden konnte.

Beim Vergleich der Oberflächenhöhenprofile der Pellikelschichten zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied abhängig von den Materialien. Das Substrat wirkte sich offenbar auf das Oberflächenhöhenprofil der Pellikel in den ersten Minuten der Pellikelbildung aus. Die genau ermittelten Werte wurden in Kapitel 4.1.5.1 aufgeführt.

Nach einer 3- und 30-minütigen intraoralen Expositionszeit hatten die Pellikel auf den Pt-Araldit-Proben bukkal mit ca. 12 nm (nach 3 min) und 30 nm (nach 30 min) ein ca. 5 mal höheres Oberflächenhöhenprofil als die Pellikelschichten auf den Siliziumoxid-Wafer-Proben mit nur 2,5 nm (nach 3 min) und 6 nm (nach 30 min) (aus Diagramm 1a und 1c). Nach einer 120-minütigen intraoralen Expositionszeit war das Oberflächenhöhenprofil der Pellikel auf Pt-Araldit jedoch nur noch doppelt so hoch wie das Höhenprofil der Pellikel auf Siliziumoxid-Proben (aus Diagramm 1c).

Bei palatinaler Lokalisation der Substrate waren die Ergebnisse beim Vergleich der Oberflächenhöhenprofile entsprechend. Nach 3- und 30-minütiger Exposition der Substrate war das Höhenprofil der Pellikel mit 10 nm (nach 3 min) und 12 nm (nach 30 min) ungefähr 4 mal so hoch wie das Höhenprofil der Pellikel auf Siliziumoxid mit 2,5 nm (nach 3 min) und 3 nm (nach 30 min) (aus den Diagrammen 1a und 1b) und nach 120-minütiger Expositionszeit verringerte sich der Unterschied im Höhenprofil der Pellikel auf das dreifache von 10 nm auf Pt-Araldit und 3 nm auf Siliziumoxid (Diagramm 1c).

Diese Ergebnisse unterstützen die schon in diversen Artikeln beschriebene Annahme, dass die intraorale Expositionszeit der Proben und die unterschiedliche freie Oberflächenenergie von Substraten die Pellikelbildung beeinflussen (Arvidsson et al. 2004 und Hannig M. et al. 2007). Platin gehört zur Gruppe der hydrophilen Metalle und besitzt eine positive Oberflächenladung. Der Wasser-

kontaktwinkel beträgt nach einer Untersuchung von Kimura und Maruyama (2002) um die 20° Grad. Der sehr hydrophile Siliziumoxid-Wafer besitzt hingegen eine negative geladene Oberfläche und der Wasserkontaktwinkel beträgt um die 10° Grad (Mantz 2008). Eine Studie von Fletscher und Loeb (1979) beschäftigte sich schon damals mit der Anheftung von Pseudomonas-Bakterien auf verschiedenen Substraten und fand eine unterschiedliche Bakterienanheftung in Abhängigkeit von den hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften der Substrate (hydrophile Metalle wie Platin und Germanium und hydrophobe Kunststoffe).

Gray (2004) untersuchte aus physikalisch-wissenschaftlicher Sicht die Interaktionen von Proteinen an Festkörpern. Er zeigte, dass die meisten der stattfindenden Proteinvernetzungen durch elektrostatische Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte verursacht wurden und dass daher eine Abhängigkeit der Vernetzungen von den Oberflächenladungen, von den Protein-Dipol-Momenten, von der Proteingröße und von der Ionenkonzentration angenommen werden kann. Eine Studie von Quinn et al. (2008) zeigte ebenso, dass die verschiedenen Van-der-Waals-Kräfte der Materialien die Pellikeladsorption nicht unerheblich beeinflussen.

Diese Erkenntnisse könnten unter anderem eine Erklärung für die unterschiedlichen Oberflächenhöhenprofile der Pellikel bei den beiden Materialien in der vorliegenden Studie sein. Nach älteren Studien sollten diese materialabhängigen Eigenschaften jedoch nach vollzogener initialer Pellikelbildung maskiert werden und die weitere Pellikelbildung mit ihren Umbauprozessen unabhängig auf allen Materialien gleich stattfinden (Baier und Glantz 1978, Glantz 1979). Auch Lockowandt et al. (1991) erzielten mittels Kontaktwinkelbestimmungen ähnliche Ergebnisse. Sie fanden nach Pellikelbildung auf verschiedenen dentalen Werkstoffen eine relative Vereinheitlichung der Kontaktwinkelwerte und zeigten eine Erhöhung der Oberflächenenergie aller Werkstoffe beziehungsweise eine Verbesserung der Benetzbarkeit. Handelte es sich jedoch nur um eine sehr dünne Pellikel und eine unvollständige Maskierung der Oberfläche, so war es denkbar, dass der darunter liegende Werkstoff den Kontaktwinkelwert noch zusätzlich beeinflusste.

Die Annäherung der Oberflächenhöhenprofile der Pellikel auf den in der vorliegenden Studie untersuchten beiden Materialien nach 120-minütiger intraoraler

Exposition passte zu dieser Annahme der Maskierung der Oberflächeneigenschaften von Materialien nach vollzogener primärer Pellikelbildung.

Eine AFM-Studie von Hannig M. et al. (2004), die die Pellikelbildung auf hydrophilem Katzungold (Mica), Silizium-Wafer sowie dem hydrophoben Graphit untersuchte, zeigte vergleichbare Erkenntnisse. Der sichtbare Biofilm stellte sich im AFM auf allen Substraten gleich dar und auch die globulären Strukturen zeigten sich mit Durchmessern von 15 ± 3 nm und einer Höhe von $2 \pm 0,5$ nm auf allen Oberflächen. Unterschiede waren jedoch auch hinsichtlich der Pellikelbildungsrate zu sehen. Die hydrophilen Silizium-Wafer- und Katzungold-Proben waren nach schon 60 s komplett mit einem Pellikelfilm bedeckt, wohingegen derselbe Grad an Pellikelbedeckung auf dem hydrophoben Graphit erst nach 10 min eintrat.

Die unterschiedlichen Oberflächenhöhenprofile der Pellikel in der vorliegenden Studie auf Pt-Araldit und Siliziumoxid könnten also von der unterschiedlichen Hydrophilie der Materialien und den gegensätzlich geladenen Oberflächen der Prüfkörper resultieren.

Ein weiterer zu bedenkender Faktor stellte in diesem Fall die Auswertung der Proben mit dem Rasterkraftmikroskop dar. Die im AFM-Bild zu betrachtende Pellikeloberfläche spiegelte nicht unbedingt die wahrhaftige Pellikeloberfläche Eins zu Eins wieder, da die Wiedergabe von der Auflösungsqualität und der Wechselwirkung zwischen Tip und Probe abhängt. Experimentelle Bestätigungen zeigten, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Tip und der Probe die Ergebnisse stark beeinflussen können (Müller und Engel 1997). Es ist bis heute nicht hinreichend geklärt, inwiefern und wieviel die globuläre Oberflächenoptik von dem wirklichen, natürlichen Oberflächenzustand der Pellikel abweicht. Die Auswertung der Durchmesser der globulären Strukturen wurde in der vorliegenden Studie der Auflösung des verwendeten Tips angepasst und entsprechend umgerechnet. Die verwendete Formel wurde in einer Studie von Hannig M. et al. (2004) entsprechend entwickelt und hergeleitet.

5.2.2 Diskussion der Ergebnisse beim Vergleich der Expositionszeiten

Gibt es Unterschiede in der Oberflächenmorphologie der Pellikel abhängig von den unterschiedlichen intraoralen Expositionszeiten?

Bei der Auswertung der AFM-Bilder gestaltete sich die Oberflächenmorphologie der Pellikel auf Pt-Araldit- und Siliziumoxid-Wafer-Proben nach 120-minütiger intraoraler Expositionszeit heterogener als nach 3- und 30-minütiger intraoraler Exposition. Die nach 3-minütiger Expositionszeit der Substrate noch eher vereinzelt auftretenden globulären und granulären Strukturen in der Pellikel wurden nach 30-minütiger Expositionszeit dichter und das Erscheinungsbild der Pellikel wurde homogener. Die Löcher, die in der Pellikeloberfläche nach 3 min und 30 min noch auftraten, verschwanden nach 120-minütiger intraoraler Expositionszeit der Prüfkörper, so dass hier eine vollständige Maskierung der Substratoberfläche mit Pellikel angenommen werden konnte. Die Oberflächentopografie der Pellikel gestaltete sich nach 120-minütiger Exposition der Proben insgesamt feingranulärer und heterogener als nach 30-minütiger Expositionszeit. Die Durchmesser der granulär-globulären Strukturen variierten von kleinen Durchmessern der Granula von nur 2 nm (Abbildung 13b) bis hin zu größeren Globuli mit Durchmessern um die 135 nm (Abbildung 11b).

Die unterschiedlichen mikromorphologischen Erscheinungsformen der Pellikel nach den drei intraoralen Expositionszeiten bestätigten schon vorhandene Erkenntnisse einer AFM-Studie von Hannig M. et al. (2001) zur Pellikelbildung auf Schmelz und Glas. In der Studie wurde ermittelt, dass sich die Pellikelbildung einem Phasen-Prozess unterzieht. Es lagern sich zunächst eher einzelne globuläre Proteine an, die nach und nach einen dichten, homogenen Pellikelfilm bilden. Anschließend erfolgt eine Anlagerung von Protein-Agglomeraten und Protein-Aggregaten (mizellenartige Globuli), welche die Oberflächentopografie wieder heterogener aussehen lassen (Hannig M. et al. 2001).

Eine weitere AFM-Studie von Dickinson und Mann (2005) erbrachte ähnliche Erkenntnisse bei der Analyse der Pellikelbildung auf Schmelzproben. Die Proteinadsorption erfolgte nach Sekunden und das folgende Pellikelwachstum erreichte nach 30 min eine Plateau-Phase, in der die Pellikelbildungsrate abnahm. Nach zwei Stunden intraoraler Exposition zeigte sich erst eine vollkommene Maskierung der Proben.

In der vorliegenden Studie signalisierte das Verschwinden der Löcher in der Pellikeloberfläche nach 120-minütiger intraoraler Expositionszeit ebenfalls eine vollständige Maskierung der Pt-Araldit- und Siliziumoxid-Proben mit Pellikel.

Mit steigender intraoraler Expositionszeit konnte bukkal ein kontinuierlich ansteigendes mittleres Oberflächenhöhenprofil (aus den Diagrammen 2a und 2c) beobachtet werden. Bei der palatinal gebildeten Pellikel flachte sich das Oberflächenhöhenprofil nach 120-minütiger Exposition gegenüber den erzielten Werten nach 3 und 30 min wieder ab oder blieb eher gleich (aus den Diagrammen 2b und 2d). Die strukturellen Unterschiede der bukkalen und palatinalen Pellikel werden in dem Kapitel 5.2.4 noch diskutiert.

Der gesamte Pellikelbildungsprozess wird im komplexen System Mundhöhle durch viele Faktoren beeinflusst. Die unterschiedliche Pellikelbildung nach verschiedenen intraoralen Expositionszeiten hängt beispielsweise auch von der Speichelzusammensetzung ab. Der menschliche Speichel beinhaltet unter anderem einige amphiphile Proteine, Phosphoproteine, prolinreiche Proteine (PRP`s), Amylase, Lysozym, Immunoglobuline, Muzine, Lipide und Glycolipide. Bei der initialen Pellikeladsorption auf Schmelzproben sollen die Phosphoproteine und die prolinreichen Proteine aufgrund von elektrostatischen Interaktionen mit den Calcium- und Phosphat-Ionen der Schmelzoberfläche eine große Rolle spielen (Hannig M. und Joiner 2006). Welche Proteinbestandteile auf anderen Oberflächen, wie in diesem Fall auf Pt-Araldit- oder Siliziumoxid-Proben, zu den ersten sich anlagernden Bestandteilen in der Pellikel zählen, ist noch nicht hinreichend untersucht.

Man konnte in der vorliegenden Studie die Beobachtung machen, dass sich nach der initialen Pellikeladsorption die weitere Pellikelbildung höchstwahrscheinlich eher durch Anlagerung von Proteinagglomeraten als durch einzelne Proteine vollzogen hat. Die adsorbierte Pellikel auf den Pt-Araldit- und Siliziumoxid-Wafer-Proben war innerhalb der zweistündigen Bildungsphase einem Maturationsprozess ausgesetzt, der die unterschiedliche Oberflächentopografie der Pellikel nach den verschiedenen Expositionszeiten der Prüfkörper in der Mundhöhle und den phasigen Prozess der Pellikelbildung erklären könnte.

5.2.3 Diskussion der Ergebnisse bezüglich des Probandenvergleichs

Gibt es Unterschiede der Pellikel in Abhängigkeit von den Probanden?

Beim Vergleich der AFM-Bilder der Pellikelproben von den verschiedenen Probanden zeigte sich keine deutliche probandenspezifische Pellikelbildung. Die

AFM-Bilder ähnelten sich in der Oberflächenmorphologie der Pellikel unabhängig von den Probanden.

Hinsichtlich des mittleren Oberflächenhöhenprofils waren kleinere Unterschiede zwischen den Probanden in den beiden Versuchsreihen zu sehen, die jedoch keine eindeutige Aussage zu einer Abhängigkeit der Pellikelbildung von den Probanden erlaubten.

Diese Ergebnisse reihen sich in die Beobachtungen von diversen älteren Studien ein, die den Einfluss probandenspezifischer Faktoren auf die Pellikeladsorption untersuchten. Hannig M. (1998) fand bei der TEM-Analyse der Pellikel-ultrastruktur keinen Anhalt für ein individuelles, probandenspezifisches Adsorptionsmuster der Biopolymere aus dem Speichel.

Eine Studie von Jendresen und Glantz (1980) untersuchte beispielsweise über Kontaktwinkelmessungen die Benetzbarkeit der pellikelbedeckten Schmelzoberfläche bei 43 verschiedenen männlichen und weiblichen Probanden und fand beim Vergleich der Probanden keine signifikanten Unterschiede in der Oberflächenenergie.

In der vorliegenden Studie war bei Proband 1 (KH) ein mittleres Oberflächenhöhenprofil der Pellikel zwischen 10 und 25 nm festzustellen. Bei Proband 2 (IK) bewegten sich die Werte nur bei 5 bis 8 nm. Die Unterschiede im Höhenprofil der Pellikel könnten unter anderem von der unterschiedlichen probandenspezifischen Speichelproduktion und Speichelzusammensetzung verursacht worden sein. Die AFM-Bilder der Pellikel von den beiden Probanden 3 (HM) und 4 (SGT) zeigten bei gleicher Vergrößerung keine direkt erkennbaren Unterschiede in der granulär-globulären Oberflächenstruktur der Pellikel.

Eine Studie von Slomiany et al. (1986) dokumentierte Unterschiede in der biochemischen Zusammensetzung der Pellikel von kariesaktiven und kariesinaktiven Probanden.

Die unterschiedliche Verteilung von aktiven Enzymen oder von Immunglobulinen und Blutgruppensubstanzen in der gebildeten Pellikel zeigte in älteren Studien durchaus eine probandenspezifische Charakteristik (Kraus et al. 1973, Al-Hashimi und Levine 1989).

TEM-Untersuchungen von Sönju Clasen et al. (1997) stellten fest, dass die Pellikel auf Milchzähnen Unterschiede im Vergleich zu der Pellikel auf perma-

nenten Zähnen in der globulären Struktur aufwies. Dies könnte an dem geringeren Proteingehalt des kindlichen Speichels liegen.

Eine Studie von Hannig C. et al. (2004) unterstützte die Theorie der individual-spezifischen Pellikelreifung. Die Aktivität der in der Pellikel immobilisierten Amylase zeigte intra- und interindividuelle sowie lokalisationsbedingte Unterschiede (Hannig C. et al, 2004).

Demgegenüber zeigten Rykke et al. (1990) über Aminosäureanalysen der auf Zahnschmelz gebildeten Pellikel, dass die verschiedenen Pellikelbestandteile, die die individuelle Pellikelcharakteristik ausmachen, scheinbar nur in Spuren in der Pellikel enthalten sind. Rykke et al. (1990) kamen zu dem Ergebnis, dass die generelle Aminosäurezusammensetzung der Pellikel nicht probandenabhängig beeinflusst wird und konnten sogar über einen Untersuchungszeitraum von zwei Jahren zeigen, dass die Aminosäurezusammensetzung der 2-h-Pellikel auf bukkal getragenen Schmelzproben keine intra- oder interindividuellen Unterschiede bei den Probanden aufweist.

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die Pellikelbildung an sich eher probandenunabhängig erfolgt. Die Unterschiede der Oberflächenhöhenprofile der Pellikel von den Probanden 1 und 2 (KH und IK) im Vergleich zu den Pellikel von den Probanden 3 und 4 (HM und SGT) sind daher wahrscheinlich auch nicht probandenspezifisch, sondern eher durch die materialspezifischen Parameter beeinflusst (siehe 5.2.1).

5.2.4 Diskussion der Ergebnisse des Lokalisationsvergleichs

Gibt es Unterschiede in der Oberflächenmorphologie der Pellikel abhängig von der unterschiedlichen intraoralen Lokalisation?

In dieser Studie konnte ein lokaldisponierender Einfluss auf die Pellikelbildung festgestellt werden. Bei der Pellikelbildung war nach einer 3-minütigen intraoralen Expositionszeit der Pt-Araldit- und Siliziumoxid-Proben noch kein deutlicher Unterschied im mittleren Höhenprofil der bukkal und palatinal gebildeten Pellikel zu erkennen (Diagramm 3a). Im weiteren Verlauf der Pellikeladsorption unterlag die Oberflächenmorphologie unabhängig von der chemischen und mechanischen Oberflächenqualität der Substrate jedoch lokalspezifischen Differenzen. Ab einer intraoralen Expositionszeit von 30 min war auf allen Proben bukkal ein

höheres mittleres Oberflächenhöhenprofil festzustellen als palatinal (aus den Diagrammen 3b und 3c) und die Oberflächentopografie der Pellikel schien palatinal mit der Zeit feiner zu werden als bukkal.

Diese Ergebnisse belegen die schon in diversen Studien gemachten Beobachtungen, wonach die Pellikel in den verschiedenen Regionen der Mundhöhle eine unterschiedliche Schichtstärke besitzt. Lockere, globuläre Pellikelbildungen wurden nur in Bereichen gefunden, die wenig Scherkräften in der Mundhöhle ausgesetzt waren, wie bukkal im Bereich der oberen Molaren. Diese lockeren aufgelagerten Schichten konnten daher auf den palatinalen Prüfkörperoberflächen, die dem mechanisch-abrasiven Einfluss der Zunge ausgesetzt waren, nicht nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse fand Hannig M. (1997,1998) bei der transmissionselektronenmikroskopischen Analyse intraoral lokal variierender Pellikelproben. Die palatinale Pellikel bestand vielfach nur aus einer 10-20 nm dünnen elektronendichten Biopolymerschicht.

Eine ältere Studie von Hannig M. und Bößmann (1987) zeigte die hohe Widerstandskraft dieser basalen Pellikelschicht gegenüber mechanisch-abrasiven Einflüssen. Eine weitere Studie aus dem Jahr 1999 verifizierte die gefundenen Erkenntnisse. Bukkal gebildete Pellikel zeigten schon nach 30-minütiger intraoraler Expositionszeit eine heterogen geschichtete, globuläre Ultrastruktur der Pellikel mit lockerem Kontakt zur elektronendichteren Basisschicht mit einer Gesamtschichtdicke von bis zu 300 nm. Lingual gebildete Pellikel waren nicht so komplex in ihrer Ultrastruktur und zeigten nach 60-minütiger intraoraler Expositionszeit geringere Schichtstärken von nur ca. 30-50 nm (Hannig M. 1999). Eine Ursache für die unterschiedlichen Pellikelformationen könnte auch die unterschiedliche Enzymaktivität innerhalb der Pellikel sein. Eine neuere Studie von Hannig C. et al. (2004) befasste sich mit der Aktivität der immobilisierten Amylase in der Pellikel und zeigte bukkal und lingual beispielsweise unterschiedliche Enzymaktivität. Dies könnte auch für andere in der Pellikel enthaltene Enzyme der Fall sein, die an dem Maturationsprozess, dem die Pellikel unterliegt, beteiligt sind. Die „Verfeinerung“ der Oberflächentopografie der Pellikel palatinal, die in dieser AFM-Studie zu beobachten war, könnte von den unterschiedlichen Umbauprozessen der Pellikel bukkal und palatinal verursacht sein. Um diese Annahme zu bestätigen, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Hinsichtlich der Widerstandskraft der Pellikel gegen Säurelöslichkeit zeigten Hannig M. und Balz (1999, 2001), dass die palatinal gebildete Pellikel beispielsweise in Zitronensäure schneller löslich ist als lingual und bukkal gebildete Pellikel, was ebenfalls auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der Pellikel hindeutet. Die Unterschiede in der Oberflächenmorphologie der bukkalen und palatinalen Pellikel in Abhängigkeit von der Lokalisation und unabhängig vom Material der Proben zeigten, dass in diesem Fall beim Vergleich der bukkalen und palatinalen Pellikel die materialspezifischen Faktoren eine untergeordnete Rolle spielten.

5.3 Diskussion der ellipsometrischen Analyse der Pellikelbildung auf verschiedenen Substraten

Gibt es einen Einfluss des Substrates auf die Pellikeldicke?

Die im zweiten Teil der vorliegenden Studie genutzten Substratoberflächen Siliziumoxid und OTS unterschieden sich in ihren physikalischen Oberflächeneigenschaften. Es stellte sich die Frage nach dem Einfluss der Substrate auf die Pellikelbildung nach den drei intraoralen Expositionszeiten von 3 min, 30 min und 120 min. In dem AFM-Teil dieser Arbeit befassten wir uns schon einmal mit der Abhängigkeit der Pellikelbildung von der Materialoberfläche. Dort verwendeten wir jedoch nur hydrophile Materialien wie den Siliziumoxid-Wafer, der einen kleinen Wasserkontaktwinkel von unter 10° Grad aufweist und eine Oberflächenenergie von ca. 64,2 mJ/m² hat (Quinn et al. 2008, Mantz 2008).

Der hydrophobe OTS-beschichtete Wafer hingegen weist einen hohen Wasserkontaktwinkel von ca. 110° Grad auf und hat eine Oberflächenenergie von ca. 24,1 mJ/m² (Quinn et al. 2008, Mantz 2008). Mantz (2008) untersuchte die zwei Substrate unter anderem auch mittels der Rasterkraftmikroskopie auf ihre Oberflächenrauheitswerte und fand dort allerdings keine nennenswerten Unterschiede ($R_{RMS} = 0,09$ nm Siliziumoxid/ $R_{RMS} = 0,12$ nm OTS). Auf Grund der unterschiedlichen Oberflächenbenetzbarkeit der beiden Substrate würde man folglich annehmen, dass Speichelproteine unter Mundhöhlenbedingungen auf den Substraten unterschiedlich adsorbieren.

Die Proben wurden an den oberen Molaren bukkal und palatinal für 3 min, 30 min und 120 min von den Probanden 3 und 4 (HM und SGT) getragen. In Diagramm 4 wurden die gesammelten Ellipsometriedaten nach Lokalisation, Proband und Zeiteinheit aufgeführt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der ellipsometrischen Pellikelanalyse mussten als Relativwerte und nicht als Absolutwerte betrachtet werden. Die statistische Analyse der Messungen zeigte nur vereinzelt statistisch signifikante Ergebnisse abhängig vom Substrat. Beim Vergleich der signifikanten Ergebnisse zeigte sich bei SGT nach 3 min bukkal eine Pellikelschichtdicke von 9,4 nm auf Siliziumoxid und von 5,4 nm auf

OTS. Bei HM zeigte sich nach 30 min bukkal eine Pellikeldicke von 19,1 nm auf Siliziumoxid und von 8,8 nm auf OTS und nach 120 min bukkal eine Pellikelschicht von 11,8 nm auf Siliziumoxid und von 6,6 nm auf OTS. Insgesamt konnte man feststellen, dass auf OTS weniger Pellikel adsorbierte als auf Siliziumoxid.

Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit diversen älteren Untersuchungen. Glantz (1979) und Hannig M. (1997) fanden heraus, dass eine Pellikelbildung auf allen Oberflächen, die der Mundhöhle ausgesetzt sind, stattfindet. Weitere Studien beschäftigten sich mit der Untersuchung der Pellikelbildung und der Proteinadsorption auf Oberflächen unterschiedlicher Oberflächenenergie und fanden eine Abhängigkeit des Adsorptionsprozesses von der Oberflächenenergie (Baier und Glantz 1978, Arvidson et al. 2004). Eine Studie von Hannig M. et al. (2007) unterstreicht die Ergebnisse insofern, als dass die Pellikelbildung nicht nur von der Expositionszeit oder der Speichelzusammensetzung, sondern auch von der Oberflächenenergie der Proben beeinflusst wird. Eine Beschichtung von Schmelz und Titan mit einer Nano-Composite-Schicht, die die Oberflächenenergie der Materialien herabsetzte, zeigte eine verringerte Biofilmbildung auf den beschichteten Proben mit geringerer Oberflächenenergie (Hannig M. et al. 2007). Dies wurde auch in der vorliegenden Studie beobachtet.

Für die palatinale Lokalisation der Proben konnten keine statistisch relevanten Unterschiede der Pellikeldicke auf den verschiedenen Substraten gefunden werden. Bei Zusammenfassung der ellipsometrischen Messungen konnten statistisch signifikante Unterschiede der Pellikeldicke auf Siliziumoxid und OTS nur für die bukkalen 3-min- und 30-min-Pellikelschichten gefunden werden.

Nach einer 120-minütigen intraoralen Expositionszeit der Substrate konnte in dieser Studie bei Betrachtung der Daten hingegen keine statistisch signifikante Aussage zum Einfluss des Substrates auf die Pellikelbildung gemacht werden. Vorhergehende Studien beschrieben eine Maskierung der Substratoberflächen durch die Adsorption der Pellikel, die dann den weiteren Biofilmbildungsprozess bestimmen sollte (Lockowandt et al. 1991, Hannig M. 1998, Hannig M. et al. 2004). Um der Frage nach dem Einfluss des Substrates auf die Pellikelbildung weiter nachzugehen, müssten zusätzliche ellipsometrische Messungen auf verschiedenen Materialien durchgeführt werden.

5.4 Diskussion des Methodenvergleichs von AFM, Ellipsometrie und TEM

In dieser Studie wurde ein Methodenvergleich der Rasterkraftmikroskopie, der Transmissionselektronenmikroskopie und der Ellipsometrie zur Analyse der Pellikeladsorption an Oberflächen durchgeführt. Die Diskussion der Ergebnisse des Methodenvergleichs richtete sich nach den folgenden Fragestellungen:

- Stimmen die Ergebnisse der drei Messmethoden überein?
- Welche Unterschiede gibt es zwischen den Methoden?
- Wo liegen Schwierigkeiten und Fehlerquellen?
- Genügt die Auswertung mittels einer Messmethode?

Das Rasterkraftmikroskop (AFM) erlaubte die Darstellung der Oberflächentopografie der In-situ-Pellikel. Das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) lieferte uns Bilder des Querschnitts durch die pellikelbehaftete Probe und das Ellipsometer konnte als zerstörungsfreies Prüfverfahren artefaktfrei die durchschnittliche Schichtdicke beziehungsweise die adsorbierte Menge an Pellikel auf den Probenoberflächen bestimmen. Jedes angewendete Verfahren hatte Vor- und Nachteile und lieferte uns Ergebnisse, deren Vergleichbarkeit in dieser Studie überprüft wurde.

5.4.1 Stimmen die Ergebnisse der drei Messmethoden überein?

Bei Betrachtung der bukkalen Pellikel von Probandin KH (Abbildung 22) war im AFM-Bild eine recht grobe granuläre Oberflächenstruktur sichtbar, die beispielsweise nach alleiniger Begutachtung des TEM-Bildes nicht zu vermuten war. Das TEM-Bild wies zwar ebenso die granuläre Struktur der Pellikel auf, jedoch nur über einen geringeren Bildausschnitt von hier ca. 460 nm. Das AFM-Bild erlaubte die Begutachtung der Oberflächentopografie über einen Bildausschnitt von 5x5 µm und lieferte einen sehr viel besseren Überblick über die Pellikel insgesamt. Die hohe Variation im Höhenprofil der Pellikel wurde durch den gemittelt gemessenen Ellipsometriewert nicht berücksichtigt. Wurde allein die Größenordnung der transmissionselektronenmikroskopisch und ellipsometrisch ermittelten Werte betrachtet, so passten die Ergebnisse zur

Pellikeldicke von den TEM-Analysen und den Ellipsometriemessungen weitgehend zusammen.

Verglich man die mit den verschiedenen Methoden an der palatinal gebildeten Pellikel der Probandin KH gewonnenen Ergebnisse miteinander (Abbildung 23), so zeigte sich die globulär-granuläre Oberflächenstruktur der Pellikel nicht nur in der Oberflächentopografie des AFM-Bildes, sondern hier auch im Querschnittsbild der TEM-Darstellung. Mittels des TEM gelang auch die Darstellung der globulären Strukturen im Inneren der Pellikel.

Die Darstellung der Oberflächen- sowie der Tiefenstruktur der Pellikel konnte nur mittels der transmissionselektronenmikroskopischen Analyse erzielt werden. Diese Informationen erhielt man weder aus dem AFM-Bild noch aus dem gemessenen Ellipsometriewert. Die Pellikelbereiche unterhalb der Pellikeloberfläche wurden im AFM nicht erfasst.

Die ellipsometrische Analyse beinhaltet die Möglichkeit, die Gesamtmenge an gebildeter Pellikel abzuschätzen, konnte aber keine Angaben zur inneren Struktur der Pellikel machen. Bei Schichtdicken von ca. 10-60 nm im TEM wäre der gemittelte Wert dieser Pellikelschicht abgelesen aus dem TEM-Bild mit ca. 25 nm deutlich höher als der gemessene ellipsometrische Wert von 6,98 nm. Die Umrechnung des ellipsometrischen Schichtdickenwertes in die adsorbierte Menge an Pellikel von 19,07 mg/m² passte hier in der Größenordnung eher.

Der ellipsometrische Mittelwert der bukkal gebildeten Pellikel der Probandin IK wies mit durchschnittlich 7,08 nm Pellikelschichtdicke ebenso einen sehr viel geringeren Wert auf, als man nach alleiniger Betrachtung der TEM-Bilder mit Schichtdicken von bis zu 300 nm vermuten würde (Abbildung 24). Die AFM-Darstellung passte bei diesem Vergleich jedoch zu den TEM-Pellikelbildern. Die globulär-granuläre Oberfläche und auch die Peak- und Valleybereiche, die sich im AFM-Bild darstellten, waren auch im TEM-Bild erkennbar. Allerdings ließ sich auch recht deutlich zeigen, dass das Oberflächenhöhenprofil mit maximalen Werten von ca. 10 nm im AFM-Bild nicht die Schichtdicke der Pellikel angab, die sich noch unterhalb des Oberflächenprofils befand (siehe TEM-Bilder aus den Abbildungen 24b und 24c: 10-300 nm Schichtdicken).

Die in Abbildung 25 aufgeführten Auswertungen der palatinal gebildeten Pellikel der Probandin IK verdeutlichten wiederum die sich gut ergänzenden Darstellungen von AFM- und TEM-Bildern. Die AFM-Darstellung der Oberflächentopogra-

Die Abbildung zeigt wie auch das TEM-Bild eine relativ homogene feingranuläre Struktur der Pellikeloberfläche. Der gemessene Ellipsometriewert von durchschnittlich 5,72 nm Pellikeldicke und die daraus resultierende adsorbierte Menge von 15,62 mg/m² sowie der abgelesene Wert der Pellikelschichtdicke im TEM-Bild von ca. 10-30 nm lagen hier recht deutlich in der gleichen Größenordnung. Die Ergebnisse der verschiedenen Messmethoden widersprachen sich letztlich nicht in ihrer Aussage, sondern ergänzten die verschiedenen Erkenntnisse zur Pellikel zu einem vollständigen Bild der stattfindenden Biofilmmadsorptionsprozesse.

In der Vergangenheit wurden schon viele Studien zur Untersuchung der Pellikel mittels des TEM und des AFM durchgeführt. Ellipsometrische Studien sind derzeit kaum vorhanden. Die erzielten Ergebnisse zur Pellikelstruktur mittels des TEM und des AFM, die in ihrer Aussage schon vorhandene Erkenntnisse diverser vorhergehender Studien bestätigen (Hannig M. 1997, 1998, 1999, Schüpbach et al. 2001, Vitkov et al. 2004), gewährleisten die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den ellipsometrisch gemessenen Werten.

5.4.2 Welche Unterschiede gibt es zwischen den Methoden?

Die gewählten Methoden zur Untersuchung der initialen Pellikel arbeiteten alle auf sehr unterschiedliche Art und Weise und hatten unterschiedliche Vor- und Nachteile. Alle Pellikelproben wurden vor der Untersuchung fixiert und für die Messungen vorbereitet.

Die Oberfläche der Pellikel wurde im AFM mittels des Tip abgefahren und zeigte somit Spitzen (Peaks) und Täler (Valleys) des Oberflächenreliefs der Pellikel und gewährte einen Blick von oben auf die Oberflächenmorphologie. Die Scangröße eines AFM-Bildes der Probe war auf maximal 10x10 µm eingeschränkt und die Aufnahme des Bildes dauerte relativ lange (Minuten). Man erhielt eine Darstellung der Oberflächentopografie der Pellikel. Die Schichtdicke der Pellikel auf der Probe konnte im AFM-Bild jedoch nicht bestimmt werden.

Die Analyse der Proben im TEM erforderte im Vergleich zu den anderen Messmethoden eine aufwändigere Bearbeitung der Substrate (Einbettung, Dünnschnitte). Im TEM-Bild konnte das Oberflächenprofil der Pellikel ebenfalls abgelesen werden, allerdings nur im Querschnitt längs durch die Pellikel und nicht flächig von oben wie im AFM-Bild. Die Querschnittsdarstellung der Pellikel er-

laubte bei dieser Methode eine Aussage über die minimale und auch maximale Schichtdicke der Pellikel sowie innerstrukturelle, orts aufgelöste Unterschiede. Die gemeinsame Betrachtung der AFM- und TEM-Bilder der Pellikel ließen einen Gesamteindruck der Pellikel in etwa dreidimensionaler Form entstehen, so dass sich die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem AFM und dem TEM ergänzten.

Die ellipsometrische Analyse der Substrate vermittelte einen Gesamteindruck davon, wieviel Pellikel insgesamt durchschnittlich auf einer Probe adsorbiert war. Die Messungen waren im Vergleich schnell durchzuführen und die Ellipsometrie ist als einziges der drei Methoden ein zerstörungsfreies Prüfverfahren. Allerdings stellte es eine indirekte Methode dar und erforderte die Erstellung eines optischen Modells, das in der vorliegenden Studie von Mantz (2008) entwickelt wurde. Ein weiteres Problem der ellipsometrischen Messung war die Oberflächenrauheit der Proben. Zu rauhe Oberflächen entwickeln zu starke Artefakte während der ellipsometrischen Messung.

Die Heterogenität der Pellikel im Höhenprofil wurde in den ellipsometrischen Messungen nicht erfasst. Bei Vergleich verschiedener Materialien ließ sich so beispielsweise nur darstellen, welches Material mehr oder weniger Pellikel adsorbierte.

Ein ähnlicher Vergleich wurde in dieser Studie in Kapitel 4.2 schon beschrieben. Es konnten Erkenntnisse bezüglich der Pellikeladsorption gewonnen werden, die für weitere Untersuchungen verschiedener anderer Materialien herangezogen werden könnten. Wünschenswert in der Grundlagenforschung wäre die Bestimmung der Pellikelmenge beispielsweise auf reinen Schmelz. Die ellipsometrische Analyse einer Schmelzprobe ist aus technischen Gründen jedoch noch sehr schwierig, da die Oberfläche des Materials zu große Streustrahlung bei der ellipsometrischen Messung entwickelt. Eine Gegenüberstellung der Messmethoden aus genauere physikalischer Sicht wurde von Mantz (2008) durchgeführt.

5.4.3 Wo liegen Schwierigkeiten und Fehlerquellen?

Probleme bei der Analyse von In-situ-Pellikeln entstanden zum einen bei der Bearbeitung und Vorbereitung der Prüfkörper mit der adsorbierten Pellikel und zum anderen bei der Analyse und Messung selbst.

Die Schwierigkeiten bei den TEM-Analysen lagen in der umfangreichen Präparation der Proben vor der Untersuchung. Die Pellikel wurde fixiert, dehydriert, kontrastiert, eingebettet und ultradünn geschnitten. Es konnten präparationsbedingte Fehler oder Verunreinigungen der Probe bei den vielen Arbeitsschritten rückwirkend oft nicht nachvollzogen werden.

Die Vorbereitung der Proben zur AFM- und ellipsometrischen Messung war weniger zeitaufwändig und beinhaltete präparationsbedingte Fehlerquellen lediglich bei dem Fixationsvorgang. Die Untersuchung der Auswirkungen des Fixationsvorganges der Proben auf die ellipsometrischen Messungen der Pellikeldicke ist Gegenstand der Dissertation von Sabine Güth-Thiel. Bei dem Vergleich der ellipsometrisch analysierten Proben vor und nach der Fixation zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Pellikeldicke.

Die AFM-Bilder wurden im „tapping-mode“ gemacht. Bei dieser Einstellung wurde die Probe im AFM nicht direkt an der Oberfläche abgetastet sondern über Relativbewegungen des Tip durch Kraftwechselwirkungen zwischen Tip und Probe oberhalb der Probenoberfläche. Die eingeschränkte Scangröße von max. 10x10 µm limitierte die Analyse der Pellikeloberfläche einer Probe auf diesen Ausschnitt.

Die Messung im Ellipsometer lieferte als alleinige Methode zwar die geringste Information, war aber im Vergleich zu den anderen Methoden ein zerstörungsfreies Verfahren ohne lange Vorbereitungszeit und ohne Berührung der Proben. Es wurden zudem drei Messungen von einer Probe an verschiedenen Stellen der Pellikeloberfläche durchgeführt und daraus ein Mittelwert erstellt, so dass die Analyse der Pellikel nicht auf einen kleinen Oberflächenausschnitt beschränkt war. Eine mögliche Verunreinigung der Probe noch vor der intraoralen Pellikelbildung könnte dazu führen, dass eine insgesamt höhere adsorbierte Menge an Pellikel bei der ellipsometrischen Auswertung angegeben wurde. In der Regel führte die Messung dann allerdings zu abweichenden Ergebnissen in der Messreihe, so dass verunreinigte Proben erkannt werden konnten.

Im Vergleich zeigten die TEM-Bilder unter Umständen im Querschnitt verunreinigte Stellen, die identifiziert und somit aus der Ergebnisliste gestrichen werden konnten. Die in Abbildung 26 aufgeführten Beispielbilder zeigten die TEM-Darstellungen einer Pellikel eines Probanden nach 30 min (Abbildung 26a) und nach 120 min (Abbildung 26b).

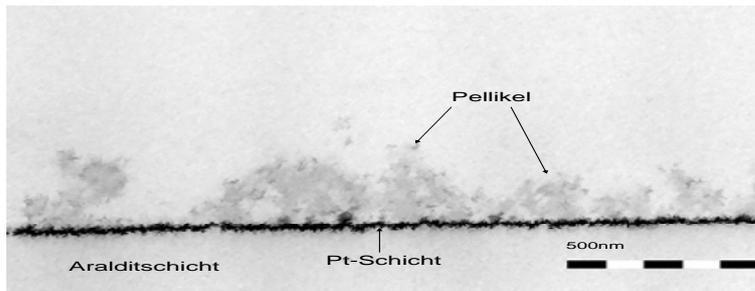


Abb. 26a: 30-min-Pellikel

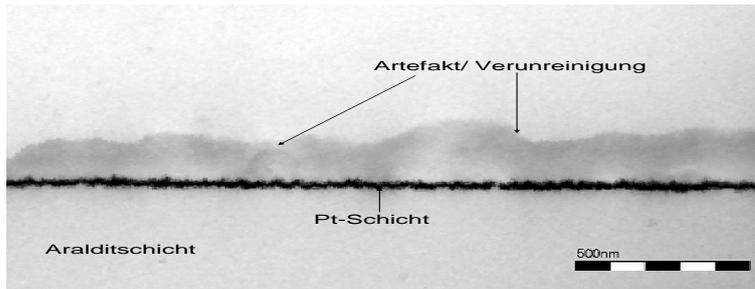


Abb. 26b: 120-min-Pellikel

Abbildung 26: Vergleich einer 30-min-Pellikel mit einer wahrscheinlich verunreinigten Probe einer 120-min-Pellikel.

Die Pellikel in Abbildung 26b zeigte eine komplett homogene helle Fläche oberhalb der Pt-Besputterung, so dass man hier von einer Verunreinigung der Probe ausgehen konnte. Wann, wie und wo die Verunreinigung stattgefunden hat, ließ sich allerdings nicht nachvollziehen.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass Verunreinigungen der Prüfkörper vor der Pellikelbildung, nach intraoraler Entnahme oder vor der Fixierung Auswirkungen bei der Auswertung der Pellikel bei allen verwendeten Methoden haben konnten. In der Regel konnten verunreinigte Proben erkannt und bei der Auswertung vernachlässigt werden. Das Ellipsometer arbeitete beim Vergleich der Methoden am artefaktärmsten. Bei der Präparation der Probe zur TEM-Messung konnte in mehreren Arbeitsschritten die Probenoberfläche verunreinigt, verfälscht oder zerstört werden und auch bei der AFM-Messung ist durch das Abrastern der Probe keine Zerstörungsfreiheit der Pellikel gewährleistet.

Die Schwierigkeit bei den ellipsometrischen Messungen lag allerdings in der begrenzten Verfügbarkeit geeigneter Prüfkörperoberflächen. Das zu untersuchende Material durfte keine große optische Eigenstreuung erzeugen, da sonst keine ellipsometrische Messung möglich war. Die Anwendung des

Ellipsometers beschränkte sich auf geeignete, flache, nicht transparente Probenmaterialien. Den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Araldit-Proben wurde aus diesem Grund die Platinschicht aufgesputtert. Insgesamt gesehen war jedoch bei allen abbildenden Methoden eine geringe Rauheit der Prüfkörperoberfläche von Vorteil, um reine Substratrauheiten von adsorbierten Strukturen unterscheiden zu können.

5.4.4 Genügt die Auswertung mittels einer Messmethode?

Beim Vergleich der drei Methoden zeigte sich in der vorliegenden Studie, dass jede einzelne Messmethode Vorteile bietet und ihre Stärken besitzt.

Zusammenfassend kann man deklarieren, dass sich alle drei Methoden bei dem Wunsch nach einer genauen Untersuchung der Pellikel im Hinblick auf die Oberflächenmorphologie sowie Schichtdicke ergänzen. Durch Kombination der Stärken der Messverfahren war ein umfassendes Bild der Struktur einer adsorbierten Pellikel zu gewinnen.

Die umfangreichste Information über die Pellikel erzielte die klassische Begutachtung der Probe im Transmissionselektronenmikroskop. Allerdings war diese Methode auch die zeitaufwändigste und beinhaltete die meisten Artefaktmöglichkeiten.

Eine schnellere Informationsquelle bot die Bilddarstellung der Pellikel im AFM, wenn die Information zur Pellikelschichtdicke nicht unbedingt gefordert war.

Die schnellste und artefaktärmste Methode war sicherlich die Auswertung der Pellikelprobe im Ellipsometer.

Die Gesamtheit an Informationen über die Pellikel, die bisher nur eine Analyse der Pellikel mit dem Transmissionselektronenmikroskop lieferte, könnte auch durch eine Kombination der Messtechniken der Rasterkraftmikroskopie und der Ellipsometrie annähernd erzielt werden, solange die exakte, ortsaufgelöste Bestimmung der Pellikelschichtdicke sowie die innerstrukturelle Morphologie der Pellikel nicht im Vordergrund der Untersuchung stehen. Somit könnte die aufwändige Bearbeitung der Probe für die Messung im TEM vermieden werden.

Klassifiziert man die Methoden anhand ihrer unterschiedlichen Vor- und Nachteile, so lässt sich schlussfolgern, dass nur eine Kombination der Erkenntnisse aus den einzelnen Methoden ein allumfassendes dreidimensionales Bild der Struktur einer In-situ-Pellikel ergibt.

6 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Die Proteinadsorption spielt in vielen Bereichen eine große Rolle. Sie ist zum Beispiel auch im Bereich der Festkörperphysik ein wichtiges Thema, wenn es um die Materialauswahl von Substratoberflächen geht, die längere Zeit einem wässrigen und feuchten Milieu ausgesetzt sind.

Bezogen auf die Zahnmedizin stellt das problematische Milieu hier die Mundhöhle dar. Wenn Speichel in Kontakt mit einer Oberfläche tritt, lagert sich innerhalb von Sekunden ein initialer Biofilm darauf ab, der unter anderem auch die weitere bakterielle Anheftung beeinflusst. Es gibt derzeit noch kein umfassendes Modell, um den komplexen Vorgang der Pellikelbildung und die damit verbundenen dynamischen Prozesse zu erklären. Mit der Kenntnis der kompletten Vorgänge könnte die Adsorption von Proteinen auf verschiedenen Oberflächen beispielsweise gezielt modelliert werden. Die gezieltere Auswahl von Zahnfüllungsmaterialien oder auch Implantatoberflächen könnte ermöglicht werden, aber auch die Modellation der Pellikel auf Zahnschmelz selbst.

Ziel dieser Arbeit war es, ein grundlegendes Verständnis über die Vorgänge bei der in-vivo intraoral stattfindenden Pellikeladsorption und ein Bild der morphologischen Struktur der Pellikel zu gewinnen sowie mögliche Vorteile von untersuchenden Methoden zu finden, die eine weitere Erforschung dieser komplexen Vorgänge ermöglichen oder vereinfachen.

Das Verfahren der Ellipsometrie stellt zum Beispiel eine neue Methode dar, um kinetische Vorgänge bei der Pellikelbildung zu untersuchen. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass dieses Verfahren durchaus zur Untersuchung von Proteinfilmen geeignet ist. In dieser Arbeit wurden viele Annahmen von bereits durchgeführten Studien zur Pellikelmorphologie, beispielsweise bezüglich der Lokalisationsabhängigkeit und der Abhängigkeit der Pellikelbildung von der intraoralen Expositionszeit, bestätigt.

Mittels der Ellipsometrie wurde in der vorliegenden Arbeit unter anderem auch ein Einfluss der Substratoberfläche auf die Pellikel gefunden. Diese Substratabhängigkeit der Pellikelbildung wurde auch aus physikalischer Sicht von Mantz (2008) und Bellion et al. (2008) analysiert. Neben den kurzreichweitigen Anteilen des Oberflächenpotenzials der Substrate können auch langreichweitige

Van-der-Waals-Wechselwirkungen und Konformationsänderungen von Proteinen den Adsorptionsvorgang der Pellikel beeinflussen.

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit sind weitere Untersuchungen wünschenswert und denkbar. Einige interessante Möglichkeiten wie beispielsweise die ellipsometrische Analyse der Pellikel auf Schmelz scheitern im Augenblick noch an den experimentellen Herausforderungen, da reiner Schmelz eine zu große Eigenstreuung aufweist und eine ellipsometrische Messung zur Zeit noch nicht ermöglicht. Eine weitere denkbare, bisher jedoch experimentell nur schwierig durchzuführende Untersuchung stellt aus physikalischer Sicht laut Mantz (2008) die AFM-Analyse von Strukturen in wässriger Umgebung dar.

Um weitere Fortschritte zur Auswertung von Proteinadsorptionen aus zahnmedizinischer Sicht erzielen zu können, werden neue Erkenntnisse der physikalisch durchführbaren Messmethoden und der Materialentwicklung notwendig sein.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Al-Hashimi I., Levine M.J.
Arch Oral Biol Vol.34 (4) (1989), pp 289-295
Characterization of in-vivo salivary-derived enamel pellicle
2. Amaechi B.T., Higham S.M., Edgar W.M., Milosevic A.
J Dent Res 78 (1999), pp 1821-1828
Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion
3. Arvidsson A., Diogo Löfgren C., Christersson C.E., Glantz P.O., Wennerberg A.
Biofouling Vol.20 (3) (2004), pp 181-188
Characterisation of structures in salivary secretion film formation. An experimental study with atomic force microscopy
4. Baier R.E., Glantz P.O.
Acta Odontol Scand 36 (5) (1978), pp 289-301
Characterization of oral in-vivo films formed on different types of solid surfaces
5. Beck U,
JOT 11 (2000),
Dünne Schichten: Ellipsometrie: Ein Reflexionsexperiment mit polarisiertem Licht
6. Bellion M., Santen L., Mantz H., Hähl H., Quinn A., Nagel A., Gilow C., Weitenberg C., Schmitt Y., Jacobs K.
J Phys Condens Matter 20 (2008), pp 1-11
Protein adsorption on tailored substrates: long-range forces and conformational changes
7. Bennick A., Chau G., Goodlin R., Abrams S., Tustian D., Madapallimatam G.
Arch Oral Biol Vol.28 (1983), pp 19-27
The role of human salivary acidic proline-rich proteins in the formation of

- acquired dental pellicle in-vivo and their fate after adsorption to the human enamel surface
8. Bradway S.D., Bergey E.J., Scannapieco F.A., Ramasubbu N., Zawacki S., Levine M.J.
Biochem J 284 (1992), pp 557-564
Formation of salivary-mucosal pellicle: the role of transglutaminase
 9. Brzoska J.B., Azouz I.B., Rondelez F.
Langmuir 10 (11) (1994), pp 4367-4373
Silanization of solid substrates: a step toward reproducibility
 10. Carlen A., Borjesson A.C., Nikdel K., Olsson J.
Caries Res 32 (1998), pp 447-455
Composition of pellicles formed in-vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition and in vitro on hydroxyapatite
 11. Clark W.B., Bammann L.L., Gibbons R.J.
Infect Immun 19 (1978), pp 846-853
Comparative estimates of bacterial affinities and adsorption sites on hydroxyapatite surfaces
 12. Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng G.K.
Sci Am 238 (1978), pp 86-95
How bacteria stick
 13. Dawes C., Jenkins G.N., Tonge C.H.
Br Dent J 115 (65) (1963), pp 65-68
The nomenclature of the integuments of the enamel surface on teeth
 14. Deimling D., Hannig C., Hoth-Hannig W., Schmitz P., Schulte-Mönting J., Hannig M.
Clin Oral Invest 11 (3) (2007), pp 211-216
Non-destructive visualisation of protective proteins in the in-situ pellicle
 15. Dickinson M.E., Mann A.B.
Mater Res Soc Symp Proc Vol.844 (2005), pp 113-118
Nanoscale characterisation of salivary pellicle
 16. Ericson T., Pruitt K.M., Arwin H., Lundstrom I.
Acta Odontol Scand 40 (4) (1982), pp 197-201
Ellipsometric studies of film formation on tooth enamel and hydrophobic silicon surfaces

17. Fletscher M., Loeb I.
Appl Environ Microbiol Vol.37 (1) (1979), pp 67-72
Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces
18. Frank R.
J Royal Society Med Vol.73 (1980), pp 265-175
Contribution of electron microscopy to oral biology: a review
19. Fujiwara H.
Wiley Intersci, New York (2007)
Spectroscopic ellipsometry: principles and applications
20. Glantz P.O.
Dental plaque and surfaces interactions in the oral cavity (1979), pp 49-64
Adhesion to the surfaces of teeth
21. Gray J.J.
Current Opinion in Structural Biol 14 (2004), pp 110-115
The interaction of proteins with solid surfaces
22. Groessner-Schreiber B., Hannig M., Dück A., Griepentrog M., Wenderoth D.F.
Eur J Oral Sci 112 (2004), pp 516-522
Do different implant surfaces exposed in the oral cavity of humans show different biofilm compositions and activities?
23. Hannig C., Attin A., Hannig M., Henze E., Brinkmann K., Zech R.
Arch Oral Biol 49 (2004), pp 469-475
Immobilisation and activity of human alpha-amylase in the acquired enamel pellicle
24. Hannig C., Hannig M., Attin T.
Eur J Oral Sci (113) (2005), pp 2-13
Enzymes in the acquired enamel pellicle
25. Hannig C., Ruggeri A., Al-Khayer B., Schmitz P., Spitzmüller B., Deimling D., Huber K., Hoth-Hannig W., Bowen W.H., Hannig M.
Arch Oral Biol 53 (2008), pp 1003-1010
Electron microscopic detection and activity of glucosyltransferase B, C and D in the in-situ formed pellicle

26. Hannig C., Spitzmüller B., Hannig M.
Clin Oral Invest 13 (2009), pp 15-21
Characterisation of lysozyme activity in the in-situ pellicle using a fluorimetric assay
27. Hannig C., Spitzmüller B., Knausenberger S., Hoth-Hannig W., Hellwig E., Hannig M.
Arch Oral Biol 53 (2008), pp 849-858
Detection and activity of peroxidase in the in-situ formed enamel pellicle
28. Hannig C., Spitzmüller B., Miller M., Hellwig E., Hannig M.
Arch Oral Biol 53 (2008), pp 416-422
Intrinsic enzymatic crosslinking and maturation of the in-situ pellicle
29. Hannig C., Wasser M., Becker K., Hannig M., Huber K., Attin T.
J Biomed Mater Res 78A (2006), pp 755-761
Influence of different restorative materials on lysozyme and amylase activity of the salivary pellicle in-situ
30. Hannig M.
Eur J Oral Sci 105 (1997), pp 422-433
Transmission electron microscopic study of in-vivo pellicle formation on dental restorative materials
31. Hannig M.
Habilitationsschriften der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Quintessenz Verlag GmbH, Berlin (1998)
Elektronenmikroskopische Untersuchungen der initialen Bioadhäsionsprozesse an Festkörperoberflächen in der Mundhöhle- eine klinisch experimentelle Studie
32. Hannig M.
Clin Oral Invest 3 (1999), pp 88-95
Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period
33. Hannig M., Balz M.
Caries Res (33) (1999), pp 372-379
Influence of in-vivo formed salivary pellicle on enamel erosion
34. Hannig M., Balz M.
Caries Res 35 (2001), pp 142-148

- Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion
35. Hannig M., Bößmann K.
Dtsche Zahnärztl Z 42 (1987), pp 1015-1020
Die Abrasivität des Pellikels unter klinischen Gesichtspunkten
36. Hannig M., Döbert A., Stigler R., Müller U., Prokhorova S.A.
J Nanosci Nanotech Vol.4 (6) (2004), pp 1-7
Initial salivary pellicle formation on solid substrates studied by AFM
37. Hannig M., Hannig C.
J Paro Impl Orale Vol.26 (3) (2007), pp 187-199
Existe-t-il un biofilm dentaire, dépourvu de bactéria, in-situ?
38. Hannig M., Herzog S., Willigeroth S.F., Zimehl R.
Colloid Polym Sci 279 (2001), pp 479-483
Atomic force microscopy study of salivary pellicles formed on enamel and glass in-vivo
39. Hannig M., Joiner A.
Duckworth RM (ed): The teeth and their environment
Monogr Oral Sci, Basel, Karger Vol.19 (2006), pp 29-64
The structure, function and properties of the acquired pellicle
40. Hannig M., Khanafer K., Hoth-Hannig W., Al-Marrawi F., Acil Y.
Clin Oral Invest 9 (2005), pp 30-37
Transmission electron microscopy comparison of methods for collecting in-situ formed enamel pellicle
41. Hannig M., Kriener L., Hoth-Hannig W., Becker-Willinger C., Schmidt H.
J Nanosci Nanotech 7 (2007), pp 4642-4648
Influence of nano-composite surface coating on biofilm formation in-situ
42. Horbett T.A.
Adv Chem Ser 199 (1982), pp 233-244
Protein adsorption on biomaterials
43. Iontcheva I., Oppenheim F.G., Troxler R.F.
J Dent Res 76 (3) (1997), pp 734-743
Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase proline- rich proteins, statherin and histatins

44. Jacobs K.
Universität Konstanz, Fachbereich Physik, Dissertation (1997)
Stabilität und Dynamik flüssiger Polymerfilme
45. Jendresen M.D., Glantz P.O.
Acta Odontol Scand 38 (6) (1980), pp 379-383
Clinical adhesiveness of the tooth surface
46. Joiner A., Elofsson U.M., Arnebrant T.
Eur J Oral Sci 114 (49) (2006), pp 337-342
Adsorption of chlorhexidine and black tea onto in-vitro salivary pellicles,
as studied by ellipsometry
47. Joiner A., Mueller D., Elofsson U.M., Arnebrant T.
Eur J Oral Sci 112(6) (2004), pp 510-515
Ellipsometry analysis of the in vitro adsorption of tea polyphenols onto
salivary pellicles
48. Joiner A., Mueller D., Elofsson U.M., Malmsten M., Arnebrant T.
Eur J Oral Sci 111 (5) (2003), pp 417-422
Adsorption from black tea and red wine onto in vitro salivary pellicles
studied by ellipsometry
49. Juriaanse A.C.
Dental plaque and surface interaction in the oral cavity (1980), pp 313-
318
Phosphoproteins and the function of the pellicle
50. Kimura T., Maruyama S.
Proc 12th Int Heat Transfer Conf, Grenoble (2002)
Molecular dynamics simulation of water droplet in contact with platinum
surface
51. Kraus F.W., Orstavik D., Hurst D.C., Cook C.H.
J Oral Pathol 2 (3) (1973), pp 165-173
The acquired pellicle: variability and subject- dependence of specific pro-
teins
52. Lehmann K.M., Hellwig E.
Urban & Fischer Verlag, 8. Auflage (1998)
Zahnärztliche Propädeutik

53. Lendemann U., Grogan J., Oppenheim F.G.
Adv Dent Res 14 (2000), pp 22-28
Saliva and dental pellicle- a review
54. Lie T.
Scand J Dent Res 85 (1977), pp 217-231
Scanning and transmission electron microscope study of pellicle morphogenesis
55. Lindh L.
Swed Dent J Suppl 152 (2002), pp 1-57
On the adsorption behaviour of saliva and purified salivary proteins at solid/ liquid interfaces
56. Lockowandt P., Loges H., Wagner I.V.
Deutsche Zahn-, Mund-, Kieferheilkunde 79 (1991), pp 147-151
Restaurative Werkstoffe und initiale Pellicelbildung
57. Mantz H.
Universität des Saarlandes, Fachbereich Physik, Dissertation (2008)
Biofilmadsorption auf maßgeschneiderten Oberflächen: Dynamik und morphologische Charakterisierung
58. Mayhall C.W.
Alabama J Med Sci 12 (3) (1975), pp 252-271
Studies on the composition of the enamel pellicle
59. Mayhall C.W., Butler W.T.
J Oral Pathol 5 (1976), pp 358-370
The carbohydrate composition of experimental salivary pellicles
60. Meckel A.H.
Arch Oral Biol 10 (1965), pp 585-597
The formation and properties of organic films on teeth
61. Mieke G., Rodewald M., Weirich T.E.
Technische Universität Darmstadt, Praktikum der Materialwissenschaft, 2.Auflage (2000)
Transmissionselektronenmikroskopie
62. Mironov V.L.
Russian Academy Sci, Nizhniy Novgorod (2004)
Fundamentals of Scanning Probe Microscopy

63. Müller D.J., Engel A.
Biophys J Vol.3 (1997), pp 1633-1644
The height of biomolecules measured with the atomic force microscope depends on electrostatic interactions
64. Nekrashevych Y.
Universität Jena, Dissertation (2001)
Quantitative analytische und mikromorphologische Bewertung der Erosion des Zahnschmelzes und der protektiven Wirkung der Pellikel. Eine in vitro Studie
65. Norde W., Ten Cate J.M., Leach S.A., Arends J.
In: Bacterial adhesion and preventive dentistry, 1. Auflage, IRL Press Ltd, Oxford (1984), pp 1-17
Adsorption of biopolymers for particle adhesion: a physico-chemical approach
66. Quinn A., Mantz H., Jacobs K., Bellion M., Santen L.
J Expl Front Phys (EPL) 81 (2008), pp 1-6
Protein adsorption kinetics in different surface potentials
67. Quirynen M., van Steenberghe D.
J Clin Periodontol 16 (5) (1998), pp 278-283
Is early plaque growth rate constant with time?
68. Rodney M., Costerton D., Costerton J.W.
Clin Microbiol Rev Vol.15 (2) (2002), pp 167-193
Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms
69. Rudee M.L., Price T.M.
J Biomed Mater Res 19 (1) (1985), pp 57-66
The initial stages of adsorption of plasma derived proteins on artificial surfaces in a controlled flow environment
70. Rykke M., Sönju T., Rölla G.
Scand J Dent Res 98 (2) (1990), pp 129-134
Interindividual and longitudinal studies of amino acid composition of pellicle collected in-vivo
71. Sagiv J.
J Am Chem Society 102 (1) (1980), pp 92-98

- Organized monolayers by adsorption.1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces
72. Scheie A.A., Eggen K.H., Rølla G.
Scand J Dent Res 95 (1987), pp 212-215
Glucosyltransferase activity in human in-vivo formed enamel pellicle and in whole saliva
73. Schilling K.M., Bowen W.H.
J Dent Res 67 (1988), pp 2-8
The activity of glucosyltransferase adsorbed onto saliva-coated hydroxylapatite
74. Scholz D.
Physikalisches Praktikum für Fortgeschrittene, Versuch 2C (2006)
Untersuchungsmethoden der Nanotechnologie: Oberflächenanalyse mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie
75. Schüle H.
Arch Oral Biol 4 (1961) , pp 40-49
Chemische Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften des Schmelzoberhäutchens
76. Schüpbach P., Oppenheim F.G., Lendenmann U., Lamkin M.S., Yao Y., Guggenheim B.
Eur J Oral Sci 109 (2001),pp 60-68
Electron-microscopic demonstration of proline-rich proteins, statherin and histatins in acquired enamel pellicle in-vitro
77. Siqueira W.L., Zhang W., Helmerhorst E.J., Gygi S.P., Oppenheim F.G.
J Proteome Res 6 (6) (2007), pp 2152-2160
Identification of protein components in in-vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS
78. Skjörland K.K., Rykke M., Sönju T.
Acta Odontol Scand 53 (1995), pp 358-362
Rate of pellicle formation in-vivo
79. Slomiany B.L., Murty V.L., Zdebska E., Slomiany A., Gwozdziński K., Mandel I.D.
Arch Oral Biol 31 (1986), pp 187-191

- Tooth surface-pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic-acid diffusion in man
80. Slomiany B.L., Murty V.L., Mandel I.D., Sengputa S., Slomiany A.
Arch Oral Biol 35 (1990), pp 175-180
Effect of lipids on the lactic acid retardation capacity of tooth enamel and cementum pellicles formed in-vitro from saliva of caries-resistant and caries-susceptible human adults
81. Sönju Clasen A.B., Hannig M., Skjörland K., Sönju T.
Acta Odontol Scand 55 (1997), pp 339-343
Analytical and ultrastructural studies of pellicle on primary teeth
82. Sönju T.
In: Thylstrup A., Fejerskov O.: Textbook of cariology, Munksgaard, Copenhagen, Chapter 4 (1986), pp 46- 55
Pellicle- formation, composition and possible role
83. Sönju T., Christensen T.B., Kornstad L., Rölla G.
Caries Res 8 (1974), pp 113-122
Electron microscopy, carbohydrate analyses and biological activities of the proteins adsorbed in two hours to tooth surfaces in-vivo
84. Sönju T., Rölla G.
J Periodont Res 7 (Suppl Nr 10) (1972), pp 20-21
Pellicle formation on mylar strips and other artificial surfaces
85. Sönju T., Rölla G.
Caries Res 7 (1973), pp 30-38
Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in-vivo. Rate of formation and amino acid analysis
86. Tabak L.A., Levine M.J., Jain N.K., Bryan A.R., Cohen R.E., Monte L.D., Zawacki S., Nancollas G.H., Slomiany A., Slomiany B.L.
Arch Oral Biol 30 (1985), pp 423-427
Adsorption of human salivary mucins to hydroxyapatite
87. Tabak L.A., Levine M.J., Mandel I.D., Ellison S.A.
J Oral Pathol 11 (1982), pp 1-7
Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity

88. Universität Bayreuth
Physikalische Chemie, Hauptpraktikum (2004)
Versuch: Schichtdickenbestimmung durch Ellipsometrie
89. Vacca-Smith A.M., Bowen W.H.
Arch Oral Biol 45 (2000), pp 277-291
In-situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs
90. Van der Mei H.C., White D.J., Kamminga-Rasker H.J., Knight J., Baig A.A., Smit J., Busscher H.J.
Eur J Oral Sci 110 (6) (2002), pp 434-438
Influence of dentifrices and dietary components in saliva on wettability of pellicle-coated enamel in-vitro and in-vivo
91. Vassilakos N., Arnebrandt T., Glantz P.Q.
Scand J Dent Res 101 (1993), pp 133-137
An in-vitro study of salivary film formation at solid/ liquid interfaces
92. Vassilakos N., Glantz P.Q., Arnebrandt T.
Scand J Dent Res 101 (5) (1993), pp 339-343
Reflectometry: a new method for quantitative determination of intraoral film formation
93. Vitkov L., Hannig M., Nekrashevych Y., Krautgartner W.D.
Eur J Oral Sci 112 (2004), pp 320-325
Supramolecular pellicle precursors
94. Vitorino R., Calheiros-Lobo M.J., Duarte J.A., Domingues P.M., Amado F.M.
J Sep Sci 31 (3) (2008), pp 523-537
Peptide profile of human acquired enamel pellicle using MALDI tandem MS
95. Yao Y., Grogan J., Zehnder M., Lendenmann U., Nam B., Wu Z., Costello C.E., Oppenheim F.G.
Arch Oral Biol 46 (2001), pp 293-303
Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry
96. Yao Y., Lamkin M.S., Oppenheim F.G.
J Dent Res 79 (4) (2000), pp 930-938
Pellicle precursor protein crosslinking: characterization of an adduct be-

tween acidic proline-rich protein (PRP-1) and statherin generated by transglutaminase

97. Young A., Rykke M., Rölla G.

Acta Odontol Scand 57 (1999), pp 105-110

Quantitative und qualitative analyses of human salivary micelle-like globules

98. Zahradnik R.T.

J Dent Res 58 (1979), pp 2066-2073

Modification by salivary pellicles of in-vitro enamel remineralisation

99. Zahradnik R.T., Moreno E.C., Burke E.J.

J Dent Res 55 (1976), pp 664-670

Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in-vitro

100. Zimehl R., Hannig M.

Progr Colloid Polym Sci 117 (2001), pp 42-46

Adsorption onto tooth enamel- the biological interface and its modification

8 ANHANG

8.1 Tabellen zu den Ellipsometriemessungen aus Kap. 4.2

Tabelle 3: Überblick über die Anzahl der ellipsometrisch analysierten Pellikelproben der beiden Probanden 3 und 4 (HM und SGT) auf Siliziumoxid und OTS.

Substrat	Expositionszeit		Proband		Total
			SGT	HM	
SiO ₂		3min	12	12	24
		30min	12	12	24
		120min	12	12	24
	Total		36	36	72
OTS		3min	24	24	48
		30min	24	24	48
		120min	24	24	48
	Total		72	72	144

Tabelle 4: Überblick über die ellipsometrischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Pellikelschichtdicken auf bukkal und palatinal getragenen Siliziumoxid- und OTS-Proben nach den drei verschiedenen intraoralen Expositionszeiten.

d (n=1,5)	Substrat	Expositionszeit	Zahn	Lokalisation	Proband	Mittelwert	N	Standardabweichung
	SiO ₂	3min	Oberer Molar	bukkal	KH	10,230167	6	7,4207281
					SGT	9,430167	6	1,8068374
					HM	5,331600	5	,4735761
			palatinal	KH	7,085667	6	1,3314217	
				SGT	6,183000	6	1,1451636	
				HM	5,877000	6	,2927258	
		30min	Oberer Molar	bukkal	KH	14,948167	6	4,3368101
					SGT	8,763667	6	3,3980813
					HM	19,131500	6	11,4544644
			palatinal	KH	6,924833	6	1,2801316	
				SGT	5,126000	6	1,3313740	
				HM	10,364000	6	5,0104337	
		120min	Oberer Molar	bukkal	KH	6,208500	6	3,3330050
					SGT	18,728333	6	6,5819146
					HM	11,840833	6	2,8756845
			palatinal	KH	8,272167	6	,2216253	
				SGT	7,196500	6	2,3083713	

OTS	3min	Oberer Molar	bukkal	HM	6,522000	4	,4147328	
				SGT	5,386716	12	2,2702225	
				HM	5,516197	12	2,1091161	
			Total	HM	5,451456	24	2,1440076	
				palatinal	SGT	5,927783	12	1,3226301
					HM	6,316795	12	2,3003004
			Total	Total	6,122289	24	1,8457476	
				SGT	SGT	5,657249	24	1,8379145
					HM	5,916496	24	2,1966677
			Total	Total	5,786873	48	2,0078670	
				bukkal	SGT	5,386716	12	2,2702225
					HM	5,516197	12	2,1091161
		Total	5,451456		24	2,1440076		
		palatinal	SGT	5,927783	12	1,3226301		
			HM	6,316795	12	2,3003004		
			Total	6,122289	24	1,8457476		
		Total	SGT	SGT	5,657249	24	1,8379145	
				HM	5,916496	24	2,1966677	
			Total	5,786873	48	2,0078670		
		30min	Oberer Molar	bukkal	SGT	7,637940	12	,9585745
					HM	8,767599	12	3,3445643
					Total	8,202770	24	2,4743159
				palatinal	SGT	17,785517	12	23,2879346
					HM	7,105993	12	2,5282783
	Total				12,445755	24	17,0933936	
	Total			SGT	SGT	12,711729	24	16,9315172
					HM	7,936796	24	3,0211352
				Total	10,324262	48	12,2709491	
	Total			bukkal	SGT	7,637940	12	,9585745
					HM	8,767599	12	3,3445643
					Total	8,202770	24	2,4743159
	palatinal		SGT	17,785517	12	23,2879346		
			HM	7,105993	12	2,5282783		
			Total	12,445755	24	17,0933936		
	Total		SGT	SGT	12,711729	24	16,9315172	
				HM	7,936796	24	3,0211352	
			Total	10,324262	48	12,2709491		
	120min		Oberer Molar	bukkal	SGT	13,291115	12	9,1128793
					HM	6,614017	12	2,0586966
					Total	9,952566	24	7,3057827
				palatinal	SGT	8,564468	12	1,6206233
					HM	6,609767	12	,7466737
					Total	7,587118	24	1,5872930
		Total		SGT	SGT	10,927791	24	6,8411416
					HM	6,611892	24	1,5144721
				Total	8,769842	48	5,3647891	
		Total		bukkal	SGT	13,291115	12	9,1128793
					HM	6,614017	12	2,0586966
Total					9,952566	24	7,3057827	
palatinal		SGT	8,564468	12	1,6206233			
		HM	6,609767	12	,7466737			
		Total	7,587118	24	1,5872930			
Total		SGT	SGT	10,927791	24	6,8411416		
			SGT	10,927791	24	6,8411416		

			HM	6,611892	24	1,5144721
				8,769842	48	5,3647891
Total Total	Oberer Molar	bukkal	SGT	8,771924	36	6,2753814
			HM	6,965938	36	2,8498562
			Total	7,868931	72	4,9237593
		palatinal	SGT	10,759256	36	14,0855379
			HM	6,677518	36	1,9890534
			Total	8,718387	72	10,1969654
		Total	SGT	9,765590	72	10,8728169
			HM	6,821728	72	2,4443895
			Total	8,293659	144	7,9902493
	Total	bukkal	SGT	8,771924	36	6,2753814
			HM	6,965938	36	2,8498562
			Total	7,868931	72	4,9237593
		palatinal	SGT	10,759256	36	14,0855379
			HM	6,677518	36	1,9890534
			Total	8,718387	72	10,1969654
		Total	SGT	9,765590	72	10,8728169
			HM	6,821728	72	2,4443895
			Total	8,293659	144	7,9902493

Tabelle 5: Überblick über die ellipsometrischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Pellikelschichtdicken unabhängig von der intraoralen Lokalisation der Substrate Siliziumoxid und OTS nach den drei verschiedenen intraoralen Expositionszeiten.

d (n=1,5)					
Proband	Expositionszeit	Substrat	Mittelwert	N	Standardabweichung
SGT	3min	SiO ₂	7,806583	12	2,2261377
		OTS	5,657249	24	1,8379145
		Total	6,373694	36	2,1984543
	30min	SiO ₂	6,944833	12	3,1085721
		OTS	12,711729	24	16,9315172
		Total	10,789430	36	14,1076538
	120min	SiO ₂	12,962417	12	7,6408021
		OTS	10,927791	24	6,8411416
		Total	11,606000	36	7,0745945
	Total	SiO ₂	9,237944	36	5,4958545
		OTS	9,765590	72	10,8728169
		Total	9,589708	108	9,4013943
HM	3min	SiO ₂	5,629091	11	,4622550
		OTS	5,916496	24	2,1966677
		Total	5,826169	35	1,8290376
	30min	SiO ₂	14,747750	12	9,5923889
		OTS	7,936796	24	3,0211352
		Total	10,207114	36	6,7468360
	120min	SiO ₂	9,713300	10	3,4922102
		OTS	6,611892	24	1,5144721
		Total	7,524071	34	2,6423710
	Total	SiO ₂	10,182606	33	7,0808240
		OTS	6,821728	72	2,4443895
		Total	7,878004	105	4,6865674
Total	3min	SiO ₂	6,765174	23	1,9524031
		OTS	5,786873	48	2,0078670
		Total	6,103787	71	2,0291625

30min	SiO ₂	10,846292	24	8,0318974
	OTS	10,324262	48	12,2709491
	Total	10,498272	72	10,9834722
120min	SiO ₂	11,485545	22	6,2088360
	OTS	8,769842	48	5,3647891
	Total	9,623349	70	5,7401530
Total	SiO ₂	9,689739	69	6,2742909
	OTS	8,293659	144	7,9902493
	Total	8,745910	213	7,4913661

8.2 Tabelle zu den Ellipsometriemessungen aus Kap. 4.3

Tabelle 6: Überblick über die ellipsometrischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Pellikelschichtdicken auf bukkal und palatinal getragenen Pt-Aradit-Proben nach einer 30-minütigen intraoralen Expositionszeit bei den Probanden KH und IK.

d (n=1,5)

Substrat	Expositionszeit	Zahn	Fläche	Proband	Mittelwert	N	Standardabweichung
Pt-Aradit	30min	Oberer Molar	bukkal	IK	7,080667	3	,4781813
				KH	17,713667	3	,7701184
				Total	12,397167	6	5,8520853
			palatinal	IK	5,723333	3	,4771335
				KH	6,981333	3	,4791600
				Total	6,352333	6	,8109682
		Total	IK	6,402000	6	,8574565	
			KH	12,347500	6	5,9062648	
			Total	9,374750	12	5,0824376	
		Total	bukkal	IK	7,080667	3	,4781813
				KH	17,713667	3	,7701184
				Total	12,397167	6	5,8520853
			palatinal	IK	5,723333	3	,4771335
				KH	6,981333	3	,4791600
				Total	6,352333	6	,8109682
		Total	IK	6,402000	6	,8574565	
			KH	12,347500	6	5,9062648	
			Total	9,374750	12	5,0824376	

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines AFM (angepasst nach Scholz, physikalisches Praktikum 2006, 1a) sowie eine SEM-Aufnahme eines Hebelarmes mit Tip (Mironov 2004,1b).	24
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines TEM im Vergleich zu einem Lichtmikroskop (angepasst nach Miehe et al. 2000).	29
Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Ellipsometers (angepasst nach Uni Bayreuth 2004).	32
Abbildung 4: Ellipsometrisches Messprinzip: phasenempfindliches Reflexionsexperiment mit polarisiertem Licht. Messung der Änderung des Polarisationszustandes des Lichts (Beck 2000)...	34
Abbildung 5: Grundlegendes Messprinzip: Die Feldkomponenten definieren die ellipsometrische Grundgleichung (Mantz 2008, angepasst nach Fujiwara 2007).	35
Abbildung 6: Schematische Anordnung der Prüfkörper (Zahnbogen angepasst nach Lehmann und Hellwig 1998).....	40
Abbildung 7: Darstellung der Relation zwischen Tip und Probenoberfläche (Hannig M. et al. 2004).....	41
Abbildung 8: Simulation der ellipsometrischen Winkel bei Adsorption einer Speichelschicht unterschiedlicher Dicke (Mantz 2008).	44
Abbildung 9: Referenzbilder der Substrate ohne Pellikelschicht	51
Abbildung 10: Die AFM-Darstellungen der bukkal gewonnenen Pellikel auf Pt-Araldit nach einer intraoralen Expositionszeit von 3 min zeigen eine homogene Oberflächenmorphologie mit einzelnen Löchern in der Oberfläche.	52
Abbildung 11: Die AFM-Darstellungen der bukkal gebildeten 30-min-Pellikel auf Pt-Araldit zeigen eine granuläre Oberflächenmorphologie mit globulären Strukturen und nur noch vereinzelt auftretende Löcher.....	54
Abbildung 12: Nach 120-minütiger Expositionszeit stellt sich in der AFM-Analyse der bukkalen Pellikel auf Pt-Araldit ein weiterer Zuwachs	

	der globulär-granulären Strukturen und ein höheres mittleres Oberflächenhöhenprofil dar.....	55
Abbildung 13:	Die AFM-Darstellungen der palatinalen Pellikel auf Pt-Araldit nach einer 3-minütigen intraoralen Expositionszeit zeigen eine feine, homogene Oberflächenmorphologie und linienförmig verlaufende Löcher in der Pellikel.....	57
Abbildung 14:	Die Zunahme der granulär-globulären Strukturen und die fein verteilte flächige Anordnung der Globuli ist auch in der AFM-Analyse der palatinalen 30-min-Pellikel auf Pt-Araldit sichtbar.	58
Abbildung 15:	Die AFM-Darstellung der palatinal gewonnenen Pellikel auf Pt-Araldit nach einer intraoralen Expositionszeit von 120 min zeigt eine sehr fein verteilte heterogene Oberflächenmorphologie der Pellikel ohne Löcher.....	60
Abbildung 16:	Die AFM-Darstellungen zeigen die Oberflächenmorphologie der bukkal gewonnenen 3-min-Pellikel auf einem Siliziumoxid-Wafer. Die granuläre Struktur der Pellikel war nach den 3 min intraoraler Exposition der Substrate zu erkennen.	62
Abbildung 17:	Die 30-min-Pellikel der bukkal gewonnenen Siliziumoxid-Wafer-Proben zeigen in der AFM-Darstellung einige flächige weiße Stellen, die evtl. von Verunreinigungen der Probe vor Aufnahme der Pellikel verursacht worden sind. Die homogene Oberflächenstruktur der Pellikel mit den granulär-globulären Anteilen ist dennoch zu sehen.	63
Abbildung 18:	Die bukkal gebildete 120-min-Pellikel auf dem Siliziumoxid-Wafer zeigt bei der AFM-Analyse eine deutlich heterogene Oberflächenkörnung mit kleineren und größeren Globuli.....	65
Abbildung 19:	Die nach einer 3-minütigen Expositionszeit palatinal gebildete Pellikel auf Siliziumoxid-Wafer weist im AFM-Bild eine homogene Verteilung granulärer Strukturen auf.	66
Abbildung 20:	Die palatinal auf Siliziumoxid-Wafer gebildete Pellikel hat nach 30-minütiger intraoraler Expositionszeit im AFM-Bild eine globuläre Struktur mit inhomogen verteilten größeren Globuli in der Oberflächenmorphologie.	68

Abbildung 21: Nach 120-minütiger Expositionszeit der Siliziumoxid-Wafer-Proben zeigt sich die Pellikel in der AFM-Darstellung sehr feingranulär mit heterogen verteilten, wieder kleineren globulären Strukturen mit mittleren Durchmessern von ca. 17 nm.	69
Abbildung 22: Überblick über die Auswertung der bukkal gewonnenen Pellikelproben der Probandin KH nach 30-minütiger intraoraler Expositionszeit mit den drei verschiedenen Verfahren (AFM, TEM, Ellipsometrie).....	84
Abbildung 23: Überblick über die Auswertung der palatinal gewonnenen Pellikelproben der Probandin KH nach 30-minütiger intraoraler Expositionszeit mit den drei verschiedenen Verfahren (AFM, TEM, Ellipsometrie).....	86
Abbildung 24: Überblick über die Auswertung der bukkal gewonnenen Pellikelproben der Probandin IK nach 30-minütiger intraoraler Expositionszeit mit den drei verschiedenen Verfahren (AFM, TEM, Ellipsometrie).....	88
Abbildung 25: Überblick über die Auswertung der palatinal gewonnenen Pellikelproben der Probandin IK nach 30-minütiger intraoraler Expositionszeit mit den drei verschiedenen Verfahren (AFM, TEM, Ellipsometrie).....	90
Abbildung 26: Vergleich einer 30-min-Pellikel mit einer wahrscheinlich verunreinigten Probe einer 120-min-Pellikel.	111

10 DIAGRAMMVERZEICHNIS

Diagramm 1: Substratvergleich von Pt-Araldit und Siliziumoxid-Wafer im Hinblick auf das Oberflächenprofil der Pellikel nach den drei verschiedenen intraoralen Expositionszeiten.	71
Diagramm 2: Vergleich des Oberflächenprofils der bukkal und palatinal gebildeten Pellikel auf Pt-Araldit und Siliziumoxid-Wafer nach den Expositionszeiten von 3 min, 30 min und 120 min.	74
Diagramm 3: Lokalisationsvergleich von den bukkal und palatinal gewonnenen Pellikelproben nach 3 min, 30 min und 120 min intraoraler Exposition.	77
Diagramm 4: Das Balkendiagramm gibt einen Überblick über die ellipsometrisch gemessenen Mittelwerte der Pellikelschichtdicken auf Siliziumoxid und OTS nach drei unterschiedlichen intraoralen Expositionszeiten der Substrate.	80

11 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Überblick über das Studiendesign.....	49
Tabelle 2: Diese Tabelle zeigt die statistische Analyse (ANOVA) (p-Werte) der ellipsometrisch analysierten Mittelwerte der Pellikelschichtdicken bei Proband 3 und 4 (HM und SGT). Fett markiert sind signifikante Unterschiede für $p < 0,05$	81
Tabelle 3: Überblick über die Anzahl der ellipsometrisch analysierten Pellikelproben der beiden Probanden 3 und 4 (HM und SGT) auf Siliziumoxid und OTS.....	127
Tabelle 4: Überblick über die ellipsometrischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Pellikelschichtdicken auf bukkal und palatinal getragenen Siliziumoxid- und OTS-Proben nach den drei verschiedenen intraoralen Expositionszeiten.	127
Tabelle 5: Überblick über die ellipsometrischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Pellikelschichtdicken unabhängig von der intraoralen Lokalisation der Substrate Siliziumoxid und OTS nach den drei verschiedenen intraoralen Expositionszeiten.	129
Tabelle 6: Überblick über die ellipsometrischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Pellikelschichtdicken auf bukkal und palatinal getragenen Pt-Aradit-Proben nach einer 30-minütigen intraoralen Expositionszeit bei den Probanden KH und IK.	130

12 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Matthias Hannig danke ich zunächst sehr für die Überlassung des Themas, für das in mich gesetzte Vertrauen und das Interesse am Fortgang der Arbeit. Die stets sehr gute, unterstützende und freundliche Zusammenarbeit war sehr wichtig für mich. Vielen Dank.

Auch Fr. Dr. Karin Huber bin ich äußerst dankbar. Sie hat mir bei den schwierigen Anfängen der Studie geholfen und die statistische Auswertung der Ergebnisse betreut. Auch privat konnte ich mich immer mit Fragen an sie wenden.

Sabine Güth-Thiel danke ich für die sehr gute und nette Zusammenarbeit unter anderem im Bereich der ellipsometrischen Analysen der Proben.

Fr. Hoth-Hannig hat meine Versuche im Homburger Labor sehr unterstützt. Ich danke ihr und Fr. Kiefer, die mir beim Entstehen der TEM-Aufnahmen half, für ihre engagierte Mitarbeit an meinem Projekt.

Im Fachbereich Physik konnte ich dankenswerter Weise mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karin Jacobs zusammenarbeiten. Die Bereitstellung und Erklärung des Ellipsometers und die Möglichkeit der Nutzung der Räumlichkeiten auch an den Wochenenden waren Voraussetzungen für das Gelingen der Messungen. Fr. Prof. Dr. Jacobs und Dr. Hubert Mantz waren für alle meine Fragen offen und beantworteten sie geduldig und auch für einen Nicht-Physiker verständlich. Dr. Hubert Mantz, der bei jedem noch so kleinen Problem zur Stelle war, danke ich für die sehr gute und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Die AFM-Aufnahmen betreute neben Dr. Hubert Mantz maßgeblich der Physiker Oliver Bäumchen. Für sein Interesse an meiner Arbeit und seine Unterstützung bin ich sehr dankbar.

Christian Morgen hatte immer ein offenes Ohr für meine Computer-Probleme beim Schreiben der Arbeit. Er war stets zur Stelle und half mir zusammen mit Kristin Dörr beim Formatieren und Korrigieren der Arbeit. Das Korrekturlesen der physikalischen Bereiche der Methodenbeschreibungen übernahm Wolfgang Bost. Danke, ihr drei, und danke an alle meine Freunde, die häufig Interesse an meiner Arbeit zeigten.

Mein größter Dank geht an meine Familie. Meine Mutter Birgit und mein Bruder Tim haben mich ständig unterstützt, motiviert und mir auf allen meinen Wegen Liebe und vollstes Vertrauen entgegengebracht.

Meiner Mutter danke ich zudem für die Mithilfe bei der Korrektur des Textes.

Meinem Verlobten Lukasz danke ich ebenso besonders. Er hat mir immer den Rücken freigehalten und mir ermöglicht, an der Arbeit zu bleiben. Ohne seine Hilfe, Liebe und Motivation wäre mir die Fertigstellung der Promotionsarbeit neben meiner Berufstätigkeit sehr viel schwerer gefallen.

Posthum sage ich meinem 1998 verstorbenen Vater Hans-Josef Dank. Er weckte schon in jungen Jahren mein Interesse an den Naturwissenschaften und legte somit den Grundstein für meine folgende Studiumswahl und somit für die Möglichkeit, diese Arbeit in der vorliegenden Form zu gestalten.

Ich möchte ihm diese Arbeit widmen.