

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

**Untersuchungen zur Frage der Erzeugung von
Fluoriddeckschichten auf Zahnschmelz mittels
Natriumfluorid oder
Natriummonofluorophosphat**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von:

Ksenija Anatolij Drushinina

geb. am: 10.04.1993 in Tomsk

Tag der Promotion: 15.04.2021

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hannig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Karl

Meiner Mutter und meiner Großmutter gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Deutsche Zusammenfassung	1
1.2	Abstract	2
2	EINLEITUNG	3
2.1	Literaturübersicht	4
2.1.1	Fluoridierung und Pellikel	4
2.2	Ziel der Arbeit	13
3	MATERIAL UND METHODE	14
3.1	Prüfprodukte	14
3.1.1	Herstellung der Lösungen	15
3.2	Probenmaterial	16
3.2.1	Prüfkörperherstellung	16
3.2.2	Prüfkörperreinigung	17
3.3	Herstellung der Trageschienen	17
3.4	Probanden	18
3.5	Versuchsaufbau	19
3.5.1	<i>In-vitro</i> -Experimente	19
3.5.2	<i>Ex-situ</i> -Experimente	20
3.5.3	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung	22
3.5.4	Energiedispersive Röntgenspektroskopie	22
3.5.5	Blockface-Imaging-Verfahren	23

4	ERGEBNISSE	24
4.1	<i>In-vitro</i> -Ergebnisse	24
4.1.1	Kontrolle mit <i>aqua dest.</i>	25
4.1.2	Natriummonofluorphosphat	27
4.1.3	Natriumfluorid	28
4.1.4	Übersicht der <i>In-vitro</i> -Ergebnisse	39
4.2	Untersuchung der Fluoriddeckschicht und Detektion der Globuli	41
4.3	<i>Ex-Situ</i> -Experimente	42
4.3.1	Kontrolle mit Pellikel und <i>aqua dest.</i>	42
4.3.2	Ergebnisse der Fluoridierung auf Schmelzproben mit 3 min-Pellikel	44
4.3.3	Ergebnisse der Fluoridierung auf Schmelzproben mit 2 h-Pellikel	46
4.3.4	Übersicht der <i>Ex-situ</i> -Ergebnisse	49
5	DISKUSSION	50
5.1	Diskussion von Material und Methoden	50
5.1.1	Studiendesign und Fragestellung	50
5.1.2	Auswahl der Fluoride	50
5.1.3	Art, Herstellung und Bearbeitung der Prüfkörper	51
5.1.4	Probandenselektion	52
5.1.5	Pellikelbildung	52
5.2	Diskussion der eigenen Ergebnisse	54
5.2.1	Einfluss der Konzentration	54
5.2.2	Einfluss des pH-Wertes	55
5.2.3	Stabilität der generierten Schichten	56
5.2.4	Einfluss der Pellikel	57
5.2.5	Eindringtiefe des Fluorids	59
5.2.6	Vergleich zwischen NaF und Na ₂ FPO ₃	60

6	SCHLUSSFOLGERUNG	62
7	LITERATURVERZEICHNIS	63
8	DANKSAGUNG	73
9	LEBENS LAUF	74
10	ANHANG	75
	10.1 Übersicht aller Materialien und Geräte	75

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurde die Etablierung und Persistenz von Fluoriddeckschichten auf dem Zahnschmelz untersucht. Getestet wurden dabei die fluoridhaltigen Substanzen Natriumfluorid (NaF) und Natriummonofluorophosphat (Na_2FPO_3). Für NaF wurden die Parameter Konzentration und pH-Wert variiert sowie der Einfluss der Pellikel untersucht. Es wurden anschließend unterschiedliche Reinigungsprotokolle mit *aqua dest.* durchgeführt. Die Fluoriddeckschichten wurden mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) visualisiert und mittels Energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) auf ihre Zusammensetzung untersucht.

Die *In-vitro*-Versuche zeigten nur für NaF bei einer Konzentration von 10.000 ppm nachweislich fluoridierte Oberflächen mit CaF_2 -Deckschichten. Der Einfluss des pH-Wertes auf diese Deckschichten wurde für die pH-Werte 9,8 / 5,4 / 6,3 untersucht. Die höchsten Fluoridwerte konnten bei einem sauren pH-Wert von 5,4 gemessen werden. Bei einem pH-Wert von 6,3 war nur eine geringe Verbesserung im Vergleich zu einem pH-Wert von 9,8 zu beobachten. Bei einer niedrigen Konzentration von 1000 ppm konnten mittels NaF bei einem pH-Wert von 5,4 keine Fluoriddeckschichten ausgebildet werden. Für Na_2FPO_3 konnten bei einer hohen Konzentration von 10.000 ppm und einem pH-Wert von 6,0 nur geringe Massenanteile für Fluorid nachgemessen werden.

Die Analyse des Einflusses der Pellikel erfolgte *ex situ* an Prüfkörpern, die zuvor *in situ* für 3 min bzw. 2 h von 4 Probanden intraoral exponiert wurden. Anschließend wurden diese in NaF entweder bei einer Konzentration 10.000 ppm oder 1000 ppm inkubiert. Nur eine Inkubation in hoch dosiertem NaF führte zur Ausbildung von Fluoriddeckschichten. Durch das Blockface-Imaging-Verfahren kombiniert mit EDX konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Fluoriddeckschichten um CaF_2 -Globuli handelt. Es wurde nachgewiesen, dass eine Ausbildung von CaF_2 -Deckschichten auf dem Zahnschmelz mittels NaF (pH-Wert 5,4) generell möglich ist.

1.2 Abstract

This thesis analyses the establishing process and the persistence of fluoride layers on dental enamel. We tested the fluoride containing substances sodium monofluorophosphate (Na_2FPO_3) and sodium fluoride (NaF) under variation of the concentration and pH, and the influence of the pellicle was analysed. Afterwards different cleaning protocols using *aqua dest.* were performed. The visualisation of the generated layers for all specimens took place by scanning electron microscopy and the concentration, and distribution of fluoride were analysed using energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX).

The *in vitro* tests proved fluoridated layers only for application of NaF under concentration of 10.000 ppm. The influence of pH for the layers established by application of NaF was analysed for values of 9.8 / 5.4 / 6.3. The highest fluoride concentration was found for a pH of 5.4. A pH of 6.3 yielded only a minor improvement in comparison to 9.8. For a concentration of 1.000 ppm with a pH of 5.4 no fluoride layers could be detected. For Na_2FPO_3 even under a high concentration of 10.000 ppm and a pH of 6.0, only small amounts of fluoride and no could be found.

Analysis of the influence of the pellicle layer was carried out *ex situ* on specimens which were exposed orally for 3 min and 2 h, respectively, on 4 probands. Subsequently they were incubated in NaF for concentrations of 10.000 ppm and 1.000 ppm. After incubation in highly dosed NaF with an exposure time of 3 min as well as 2 h fluorid layers resulted. After an incubation with lower dosed NaF no fluoride layers were detectable. The blockface imaging technique combined with EDX proved that the fluorid layers are calcium fluoride globule layers.

Thus, the thesis proves that establishing CaF_2 layers on enamel is possible by using NaF (with a pH of 5.4).

2 Einleitung

Nach heutiger Definition ist Karies eine Infektionserkrankung, die durch Bakterien Zahnhartsubstanzen zerstören kann (Gängler et al., 2010; Hellwege, 2018). Laut einem Report der WHO und der Oral Health Organisation aus dem Jahre 2015 haben mehr als 95 % aller Erwachsener eine oder mehrere kariöse Läsionen. Die tägliche Anwendung von Zahnpasten mit Fluoriden ist ein fester Pfeiler der Kariesprävention geworden (Kanduti et al., 2016, Hellwege, 2018). In Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Kontrollgruppen, die mit nicht-fluoridhaltigen Substanzen behandelt wurden, eine höhere Prävalenz haben kariöse Läsionen zu bekommen als Gruppen, die fluoridhaltige Substanzen verwendeten (Griffin et al., 2007; Medjedovic, 2015).

Doch trotz der nachgewiesenen Vorteile von Zahnpasten, Mundspüllösungen und in der Zahnarztpraxis eingesetzten Lacke mit Fluoridzusatz sind die Grundlagen auf dem Gebiet der Wirkung von Fluoriden noch weitgehend unerforscht (Horst et al., 2018; Walsh et al., 2019). Grundsätzlich ist in Studien gezeigt worden, dass es möglich ist Schmelz durch fluoridhaltige Präparate zu beeinflussen. Die Hydroxylgruppe kann innerhalb der Kristallstruktur des Schmelzes bei einer Substitutionsreaktion des Apatits aus der chemischen Verbindung durch Fluor ersetzt werden, wodurch Fluorapatit entsteht (Fejerskov et al., 1981). Insbesondere im sauren Bereich ist die Fluoridierung keine reine Substitutionsreaktion mehr. Komplexe chemische Reaktionen führen zur Auflösung der ursprünglichen Kristallstruktur und zur Ausbildung von CaF_2 -Deckschichten (Aasenden et al., 1968; Grøn, 1977; Saxegaard und Rølla, 1989).

Die Ausbildung von Fluoriddeckschichten auf Zahnschmelz wurde vergleichsweise von nur wenigen Autoren untersucht. Auf Grundlage einer Studie von Petzold (2001), welcher die Möglichkeiten zur Etablierung von Fluoriddeckschichten auf dem Zahnschmelz mit Hilfe von kommerziellen Lösungen aus NaF, Aminfluorid und Na_2FPO_3 betrachtete, sollten in dieser Dissertation die Reinstoffe NaF und Na_2FPO_3 untersucht werden (Petzold, 2001). Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Etablierung von Fluoriddeckschichten sowie deren Reproduzierbarkeit unter Variation von Konzentration, pH-Werten sowie dem Einfluss der Pellikel.

2.1 Literaturübersicht

2.1.1 Fluoridierung und Pellikel

Schmelz und seine Demineralisation

Der Schmelz besteht zu 93 bis 98 Gew.% aus anorganischer Substanz. Den zweitgrößten Anteil nimmt Wasser mit 1,5 bis 4 Gew.% ein. Der Rest sind organische Bestandteile wie Proteine und Lipide (Stack, 1967; Schröder, 1992). Zusammengesetzt ist der Schmelz aus nicht stöchiometrischen Verbindungen der chemischen Verbindung von $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Kalzium und Phosphor stehen einem konstanten Verhältnis von 1:1,2 (Hellwig et al., 2013).

Schmelz beginnt unter dem sogenannten "kritischen pH-Wert" von ca. 5,5 in Lösung zu gehen, was zu einer Demineralisation führt. Dawes (2003) beschrieb, dass dieser kritische Wert nicht festgeschrieben ist. Vielmehr ist er von Konzentrationen an Kalzium und Phosphaten in der Lösung abhängig. Ist eine Lösung gegenüber einem Material, wie beispielsweise Zahnschmelz, übersättigt, dann lösen sich keine Bestandteile auf. Die Lösung liegt über dem kritischen pH-Wert. Umgekehrt, wenn der Wert unter dem kritischen pH-Wert liegt so ist die Lösung untersättigt und Mineralien werden solange herausgelöst bis die Lösung wieder gesättigt ist. Der kritische pH-Wert ist somit keine eindeutige Zahl, da die Menge an Kalzium und Phosphat in der Plaque individuell ist. Je mehr Kalzium- und Phosphationen vorhanden sind, umso niedriger ist der kritische pH-Wert (Dawes, 2003).

Allgemeine Informationen zu Fluoriden

Fluor gehört zu der Gruppe der Halogenide. Das reaktionsfreudige Gas kommt in der Natur meist in Verbindung mit anderen Elementen vor. Fluoride sind Salzverbindungen der Fluorwasserstoffsäure. Sie sind ubiquitär vorhanden. In der Natur findet man Fluoride in der Erdkruste sowie im Boden und Wasser (Mullane et al., 2016).

In Deutschland nehmen wir laut der Deutschen Gesellschaft für Ernährung täglich ca. 3 bis 4 mg Fluoride auf. Zu den wichtigsten anorganischen Fluorverbindungen zählen zum Beispiel Natriumfluorid (NaF), Kalziumfluorid (CaF_2) oder Zinn(II)fluorid (SnF_2). NaF ist eine

Verbindung, die im Vergleich zu anderen Substanzen wie Na_2FPO_3 eine bessere Bioverfügbarkeit hat und besser absorbiert wird (Ekstrand und Ehrnebo, 1980).

Untersuchungen über den Verbleib von Fluorid im Plasma nach oraler Aufnahme aus unterschiedlichen Quellen erfolgten 1975 durch Patz. Er stellte fest, dass die Aufnahme von geringen Mengen, wie in der Kariesprophylaxe üblich, deutliche Anstiege nach 30 min im Plasma und Speichel zur Folge hat. Nach zwei Stunden fiel der Fluoridgehalt jedoch stark ab. Nach einer kontinuierlichen Aufnahme von Fluorid aus dem Trinkwasser konnte zwar ein niedriger, jedoch langfristiger Anstieg der Fluoridkonzentration festgestellt werden (Patz, 1975).

Verwendung von Fluoriden in der Zahnmedizin

Fluoride sind ein wichtiger Bestandteil in der Prävention gegen Demineralisation des Schmelzes (Naujoks, 1983; Featherstone, 2009). Sie können entweder systemisch verabreicht oder lokal appliziert werden (Iheozor-Ejiofor, 2015).

Eine systemische Trinkwasserfluoridierung ist vor allem in Regionen mit einem erschwerten Zugang zu anderen Fluoridquellen sinnvoll. In der Bundesrepublik Deutschland wird das Trinkwasser aus politischen Gründen nicht flächendeckend fluoridiert, weshalb andere systemische Möglichkeiten zur Fluoridierung genutzt werden. Fluoridtabletten werden meist in Kombination mit Vitamin D an Kinder und Jugendliche verabreicht (Kanduti et al., 2016).

Die Deutsche Gesellschaft für Kinderzahnheilkunde empfiehlt ab dem Durchbruch des ersten Zahnes bis zum 2. Geburtstag zweimal täglich eine Fluoridkonzentration von 500 ppm oder alternativ 1000 ppm und bis zum 6. Lebensjahr zweimal täglich eine Fluoridkonzentration von 1000 ppm.

Eine weitere Möglichkeit der Fluoridzufuhr ist das zumeist mit Natrium- oder Kaliumfluorid, angereicherte Salz. Es enthält 250 mg Fluorid pro Kilogramm Salz. Weitere Alternativen sind die Zucker- oder Milchfluoridierung, wobei sich beide Maßnahmen nicht durchsetzen konnten (Luoma et al., 1979; Stephen et al., 1981; Künzel, 1993).

Zahnpasta stellt die am häufigsten verwendete Möglichkeit der lokalen Fluoridierung dar (Marinho et al., 2003; Wong et al., 2011). Dabei wird meistens als anorganische Substanz NaF, Na_2FPO_3 oder Zinnfluorid und als organische Substanz Aminfluorid verwendet. Es wurde festgestellt, dass die Effektivität der Fluoride bei der Kariesprävention gesteigert werden kann, indem nach dem Zähneputzen weniger Wasser zum Ausspülen benutzt oder indem die Zeit des Spülens verringert wird (Duckworth et al., 1991).

Eine andere gängige Methode für den häuslichen Gebrauch sind fluoridhaltige Spüllösungen. Lacke und Gele gehören zu den Prophylaxemaßnahmen gegen Karies, welche in regelmäßigen Abständen durch zahnärztliches Fachpersonal lokal auf Zähne aufgetragen werden.

Systemische und lokale Verwendungen von Fluoriden können aber nicht komplett unabhängig voneinander betrachtet werden. Systemische Anwendungen haben bei ihrem kurzen Aufenthalt im Mund durch den Speichel auch lokale Wirkungen. Lokale Applikationen haben wiederum systemische Auswirkungen durch das Verschlucken von geringen Fluoridmengen (Cury et al., 2019).

Kariesprotektive Wirkung der Fluoride durch Hemmung der Demineralisation

Eine Einlagerung von Fluoriden in die Schmelzoberfläche erhöht die Resistenz gegenüber erosiven Angriffen. Es verhindert die Demineralisation und fördert die Remineralisation (Feagin et al., 1980; ten Cate et al., 1981; Featherstone et al., 1982). Durch die erhöhte Affinität der Fluoridionen zum Kalzium kann die Hydroxylgruppe des Apatits $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ aus der chemischen Verbindung bei einer Substitutionsreaktion durch Fluor ersetzt werden. Dies hat zur Folge, dass schwerlösliches Fluorapatit $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F})]$ entsteht (Fejerskov et al., 1981).

Bei einem Vergleich zwischen humanen Zähnen mit einem Fluoridgehalt von 1000 ppm und Zähnen von Haien mit einem Fluoridgehalt von 30.000 ppm wurde festgestellt, dass die Demineralisationsmuster nach Säureangriffen ähnlich aussahen (Øgaard et al., 1988b). Daraus lässt sich schließen, dass gelöste Fluoridionen im Umfeld des Zahnes eine deutlich größere Bedeutung bei der Kariesprävention darstellen als Fluoridionen, die in den

Zahnschmelz eingebaut werden bzw. bereits eingebaut sind (ten Cate und Duijsters, 1983; Arends und Christoffersen, 1986; Lussi et al., 2012).

Bildung und Bedeutung von Kalziumfluorid (CaF₂)

Erstmals zeigten Untersuchungen aus dem Jahre 1953, dass sich Fluorapatit bei einer niedrigen Fluoridkonzentration bildet, wohingegen bei einer höheren Konzentration CaF₂ entsteht (McCann, 1953). Weiterhin begünstigt auch ein pH-Wert im sauren Bereich, eine längere Inkubation in der fluoridhaltigen Lösung und zusätzliche Einnahme von Kalzium die Bildung von CaF₂ (Aasenden et al., 1968; Grøn, 1977; Saxegaard und Rølla, 1989).

In einer *In-situ*-Studie wurden Zahnpasten mit Zusatz an NaF (neutraler pH-Wert) und mit Aminfluorid (saurer pH-Wert) untersucht und miteinander verglichen. Es konnte festgestellt werden, dass nach einer vierwöchigen Anwendung der aminfluoridhaltigen Zahnpasta eine Bildung von CaF₂-Schichten auf dem Schmelz eher erfolgte und höhere Fluoridwerte gemessen werden konnten als nach Benutzung der NaF-haltigen Zahnpasta im neutralen pH-Bereich (Klimek et al., 1998).

CaF₂-Schichten zeigen sich bei rasterelektronenmikroskopischer Visualisierung in Form von kugelförmigen Globuli. Es wird angenommen, dass diese Struktur auf Einlagerung von Phosphat während der Bildung auf der Zahnoberfläche zurückzuführen ist, da reines CaF₂ kubisch ist (Christoffersen et al., 1988).

In vivo lagern sich zusätzlich zu Fluoridionen auch Phosphate, Proteine und andere Bestandteile in den Schmelz ein, wodurch kein reines CaF₂ gebildet wird. Ein saurer pH-Wert erniedrigt die Hydroxidkonzentration und protoniert die Plaqueflüssigkeit zu $\text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{PO}_4^-$. Phosphationen und Hydroxylionen lösen sich aus dem Zahnschmelz. Bei einem weiteren Absinken des pH-Wertes und einer Zunahme der Protonierung wird auch schließlich Ca²⁺ aus dem Zahnschmelz freigegeben, was letztlich zur Auflösung des Apatitkristallgefüges und Bildung von CaF₂ führt (Dawes, 2003). Das CaF₂ hat die Aufgabe als pH-gesteuertes Fluoridreservoir Fluoridionen bei einer sauren Umgebung freizusetzen. Im neutralen pH-Bereich wiederum bleiben Fluoride auf der Schmelzoberfläche lange stabil (Rølla und Ekstrand 1996; Øgaard et al., 2001; Rošin-Grget, 2013).

CaF₂ galt viele Jahre für die kariostatische Wirkung als unbedeutend, da man davon ausging, dass es sich fast komplett im Speichel auflöst (Rinderer et al., 1965; Mellberg et al., 1966; McCann, 1968).

Jedoch zeigten *In-vitro*-Untersuchungen und klinische Studien, dass die Auflösungsrate von CaF₂ in der oralen Umgebung niedriger als in destilliertem Wasser ist (Dijkman et al., 1983). Speichel ist bezüglich CaF₂ untersättigt, was dazu führt, dass die entstandene CaF₂-Schicht nicht dauerhaft auf dem Zahnschmelz verbleiben kann. Jedoch fanden Caslavska et al. (1991) heraus, dass nach Applikation von sauren hochdosierten Fluoridlösungen (ca. 90.000 ppm) selbst noch nach 18 Monaten geringe Mengen an CaF₂ nachgewiesen werden konnten (Caslavska et al., 1991).

In anderen Studien konnte beobachtet werden, dass der Verlust von CaF₂ eine Anreicherung gebundenen Fluorids in initialen Schmelzläsionen zur Folge hat (Hellwig et al., 1989; Buchalla et al., 2002). Eine Auflösung der CaF₂-Schicht führt zu einer erhöhten Fluoridkonzentration im Speichel (Issa und Toumba, 2004).

Weitere Wirkungen der Fluoride

Eine weitere Wirkung von Fluoriden ist die Verlangsamung des bakteriellen Stoffwechsels. Durch Hemmung der Enolase kann die Glykolyse nicht ablaufen und somit auch weder Phosphoenolpyruvat noch Laktat gebildet werden (Stone und Werkmann, 1937; Wahab et al. 1993). Daraus resultiert eine Verlangsamung der Glukoseaufnahme und eine Inhibition der Säureentstehung (Hamilton, 1990).

Die Blockade der ATP-abhängigen Protonenpumpe durch Fluoride bewirkt ein Herabsetzen der Säuretoleranz von *Streptococcus mutans* (Hamilton, 1990). Somit wird der Leitkeim der Karies inhibiert (Marquis, 1990).

Natriumfluorid

Natriumfluorid ist ein Natriumsalz der Fluorwasserstoffsäure. Es kommt entweder als weißes, farbloses, festes und kristallines Pulver oder als Lösung vor. Anfang der 1940 Jahre wurde

NaF als die erste Fluoridverbindung zur Prophylaxe gegen Karies eingesetzt (Knutson und Armstrong, 1943).

Neben seinem Einsatz zur systemischen Fluoridierung in Wasseranlagen, im Speisesalz oder als lokale Fluoridierungsmaßnahme als Zusatz in Zahnpasten, wird NaF auch bei der Glasherstellung als Trübungs- und Flussmittel, als Holzschutzmittel sowie Reinigungsmittel verwendet. NaF wird leicht durch den Gastrointestinaltrakt aufgenommen und wieder renal ausgeschieden (Hellwig et al., 2013).

In zahlreichen Studien, die nachfolgend auszugsweise zitiert werden, wurde nachgewiesen, dass die Wirkung von NaF von seinem pH-Wert abhängig ist.

Bei einer Absenkung des pH-Wertes unter 5,5 (kritischer pH-Wert) beginnt der Mineralverlust am Zahnschmelz (Hellwig et al., 2013). Trotzdem zeigten sich in zahlreichen Studien die antierosiven Eigenschaften des NaFs erst unter diesem pH-Wert.

Eine Studie von Wiegand et al. (2009) untersuchte antierosive Eigenschaften von NaF. Es wurde nachgewiesen, dass NaF zwar in der Lage ist, bei einem pH-Wert von 1,2 den Verlust an Kalzium nach einem erosiven Angriff zu reduzieren, allerdings nicht erfolgreich den Verlust am Zahnschmelz zu kompensieren. NaF bei einem pH-Wert von 3,5 konnte den Kalziumverlust wiederum nicht aufhalten und zeigte im Vergleich zu den Kontrollgruppen keine signifikanten Verbesserungen in Bezug auf den Mineralverlust (Wiegand et al., 2009).

In einer 1988 veröffentlichten Studie von Øgaard et al. wurden orthodontische Bandapparaturen auf ihren Einfluss bei der Entstehung von Karies betrachtet. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei einer *In-vitro*-Aufnahme von NaF mit einem niedrigen pH-Wert fast doppelt so hohe Fluoridkonzentrationen gemessen werden konnten wie bei NaF mit einem neutralen pH-Wert. Es wurde weiterhin gezeigt, dass NaF mit einem neutralen pH-Wert zwar die Kariesentstehung unter der Bandapparaturs verlangsamt, sie aber nicht komplett inhibiert. Im Gegensatz dazu konnte NaF mit einem pH-Wert von 1,2 durch Formation von CaF_2 die Kariesentwicklung verlangsamen (Øgaard et al., 1988a).

Mellberg und Loertscher (1972) führten Versuche zur Fluoridaufnahme an Prüfkörpern aus gesundem Zahnschmelz durch. Dabei wurde zwischen Milchzähnen und bleibenden Zähnen unterschieden. Die verwendeten NaF-Lösungen lagen allesamt mit ihrem pH-Wert unter der

kritischen Grenze von 5,5. Generell wurde nachgewiesen, dass bleibende Zähne im Vergleich zu Milchzähnen mehr Fluorid aufnehmen können (Mellberg und Loertscher, 1972).

Durch *In-vivo*-Untersuchungen von Bruun und Stoltze (1976) konnte nachgewiesen werden, dass unter lokaler Applikation von NaF mit einem neutralen pH-Wert nach einer Woche kaum noch Fluorid nachgewiesen werden konnte (Bruun und Stoltze, 1976).

Natriummonofluorophosphat

Etwa zwanzig Jahre nach Einführung von NaF-haltigen Zahnpasten wurde Na_2FPO_3 als mögliche Fluoridquelle entdeckt. Na_2FPO_3 ist ebenfalls ein weißer, geruchloser Feststoff. Neben dem Zusatz in Zahnpasten wird es bei der Osteoporosebehandlung eingesetzt (Meunier, 1990).

Na_2FPO_3 ist im Bereich der pH-Werte 2 bis 13 in wässriger Lösung stabil, hydrolysiert jedoch bei einem pH-Wert unter 1,5. Dabei entstehen Orthophosphat und Fluoridionen, welche eine undissoziierte Flusssäure bilden, die die Magenschleimhaut stark schädigen kann. Um eine Entstehung der Flusssäure zu verhindern, sollte Na_2FPO_3 daher mit Kalziumsalzen gepuffert werden (Setnikar und Arigoni, 1988).

Na_2FPO_3 ist eine sehr stabile kovalente Verbindung. Diese diffundiert viel langsamer als ionische Verbindungen und bedingt dadurch eine relativ geringe Fluoridanreicherung in gesunden Zahnschmelz (Rieben und Kielbassa, 2006).

Petzold konnte in seiner Grundlagenstudie mit niedrig dosiertem Na_2FPO_3 nach 24 h keine Fluoriddeckschichten ausbilden. Dennoch bestätigen andere Quellen, dass Na_2FPO_3 und NaF gleichwertige kariesprotektive Eigenschaften aufweisen (Volpe, 1995). In einer anderen zweijährigen Studie wurde ebenfalls nachgewiesen, dass sowohl NaF, als auch Na_2FPO_3 ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die Inhibition von Karies zeigen. Allerdings war in dieser Studie Na_2FPO_3 fast dreimal so hoch konzentriert wie NaF (Saporito, 2000).

Im Gegensatz dazu stellten Edlund und Koch (1977) in ihren Untersuchungen fest, dass kariöse Läsionen bei Behandlung mit NaF weniger oft auftreten, als bei einer Verwendung von Na_2FPO_3 . Dazu führten sie eine dreijährige Studie durch bei der etwa 400 Schulkinder

täglich ihre Zähne mit der jeweiligen fluoridhaltigen Zahnpasta geputzt haben. Besonders im zweiten und dritten Jahr konnte ein Vorteil von NaF gegenüber Na_2FPO_3 festgestellt werden (Edlund und Koch, 1977).

Pearce und Jenkins haben NaF und Na_2FPO_3 in Bezug auf ihre antierosive Wirkung miteinander verglichen. Sie stellten fest, dass Na_2FPO_3 zwar Säureangriffe vermindern kann, in seinen protektiven Eigenschaften aber deutlich dem NaF unterlegen ist (Pearce und Jenkins, 1976).

Entstehung der Pellikel und Entwicklung zum Biofilm

In der ersten Phase bildet sich auf einer sauberen Zahnoberfläche ein „unstrukturierter azellulärer Film“. Die sogenannte „acquired pellicle“ wird auch als initialer oraler Biofilm bezeichnet. Sie hat eine Dicke von etwa 0,1 bis 1 μm (Hellwig et al., 2013). Sie entsteht durch Adsorption von Speichelkomponenten und ist frei von Bakterien. Die Pellikel unterliegt einer dauernden Regeneration und ist immer auf dem Zahnschmelz vorhanden. Zu ihren Bestandteilen gehören Lipide, Proteine, Glykoproteine und Kohlenhydrate (Hannig und Joiner, 2006).

Es konnten ionische Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Bindungen und auch hydrophobe Kräfte mit den Phosphat- und Kalziumgruppen der Zahnhartsubstanz bei der Pellikelbildung nachgewiesen werden (Vassilakos et al., 1982, 1993; Hannig und Joiner, 2006).

Das Pellikelwachstum wird über absorbierte Glykoproteine, die mit Biopolymeren interagieren, gesteuert (Lamkin et al., 1996). Saure prolinreiche Proteine, Statherine und Histatine gehen miteinander Verbindungen ein und induzieren die Anhaftung weiterer Proteine an die Pellikeloberfläche (Yao et al., 1999).

Skjørland et al. (1995) untersuchten die initiale Pellikel und stellten fest, dass diese sich nach zwei bis drei Minuten aufbaut und für 30 Minuten in diesem Zustand verbleibt. Danach verdreifacht sich die Dicke der Pellikel und bleibt danach für zehn Stunden konstant (Skjørland et al., 1995). Eine Studie von Kuboki et al. (1987) stellte fest, dass die

Pellikeldicke bis zu 30 Minuten aufgebaut wird und danach ein Plateau für die nächste Stunde erreicht (Kuboki et al., 1987).

Die Pellikel verursacht weder Karies noch Parodontopathien (Hellwege, 2013). Sie verhindert Attritionen zwischen den Zähnen, indem sie als sogenannter “lubricant”, eine Art Gleitmittel, fungiert (Berg et al., 2003; Hannig und Joiner, 2006).

Weiterhin hat die Pellikel antierosive Eigenschaften. Sie reguliert durch ihre semipermeable Proteinschutzschicht die De- und Remineralisationsprozesse. Es findet ein Austausch von Kalzium- und Phosphationen statt (Zahradnik et al., 1976). Weiterhin können auch ihre Lipide die Zahnhartsubstanz gegen Erosionen schützen (Slomiany et al., 1986; 1990).

Nach ein bis zwei Stunden binden grampositive Kokken an die Pellikel. Dazu gehören *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* sowie Aktinomyzeten. Diese werden als Frühbesiedler bezeichnet. Für die Anhaftung dieser Mikroorganismen werden elektrostatische Adsorptionsphänomene verantwortlich gemacht. Unregelmäßigkeiten und Unebenheiten am Zahnschmelz begünstigen die Auflagerung der Bakterien. Substrate in Form von energiereichen Zuckerverbindungen begünstigen die schnelle Vermehrung der Mikroorganismen (Hellwege, 2018). Im weiteren Verlauf lagern sich weitere Bakterien durch Teilung an. Diese Mikroorganismen werden Spätbesiedler genannt (Hellwig et al., 2013).

Nach einigen Wochen kann der weiche Belag als stoffwechselaktive Plaque bestehen bleiben oder sich durch Einlagerung von Mineralien in harten Zahnbelag umwandeln und sich zu Zahnstein entwickeln (Hellwege, 2013).

Einfluss der Pellikel auf die Fluoridierung

Der Einfluss der Pellikel auf Fluoride wurde bisher in nur wenigen Studien untersucht. Es wird davon ausgegangen, dass Kationen, die an Fluorid gebunden sind, in die Adsorption von Speichelproteinen an den Schmelz eingreifen und damit die Bildung einer gegen Säure resistenten Pellikelschicht fördern können (Kensche et al., 2017).

Eine Studie von Kensche et al. (2019) untersuchte 30-minütige Pellikel nach einer Spülung mit unterschiedlichen fluoridhaltigen Lösungen. Es konnte beobachtet werden, dass sich die

Pellikel nach der einmaligen Fluoridierung hinsichtlich der Dicke oder Elektronendichte nicht veränderte. Daraus wurde geschlossen, dass die Remineralisationsleistung der Pellikel durch einmalige Fluoridierung nicht verbessert wird. Die TEM-Analyse ergab aber, dass die Proteinanhaftung an erodierten Schmelzoberflächen durch fluoridhaltige Mundspülungen im Vergleich zur Kontrollgruppe verstärkt wurde (Kensche et al., 2019).

In einem Vergleich von fluoridhaltigen Gelen mit unterschiedlichen pH-Werten (7,0 und 4,75) wurde festgestellt, dass das Gel mit einem pH-Wert von 4,75 bei EDX-Analysen zu höheren Fluoridanteilen führt, als das Gel mit dem neutralen pH-Wert. Allerdings hatte die Pellikel auch in dieser Studie kaum Einfluss auf die Ausbildung von Fluoriddeckschichten (Scholz et al., 2019).

2.2 Ziel der Arbeit

Obwohl die Literatur zahlreiche Beiträge zur kariesprotektiven Wirkung von Fluoriden bietet, ist diese Studie eine der wenigen, die sich mit den Grundlagen der Ausbildung von Fluoriddeckschichten beschäftigt. Das Ziel der Studie war es zu untersuchen, ob es möglich ist mit reinem NaF oder Na_2FPO_3 Fluoriddeckschichten zu etablieren sowie eine Analyse der Persistenz und Reproduzierbarkeit dieser. Dabei wurden Konzentrationen und pH-Werte von NaF variiert. Ferner sollte dabei der Einfluss der Pellikel betrachtet werden. Weiterhin wurden die Möglichkeit einer Einlagerung von Fluorid in den Schmelz und die Zusammensetzung der Fluoriddeckschichten analysiert.

3 Material und Methode

3.1 Prüfprodukte

Eine Übersicht über alle verwendeten Verbrauchsmaterialien, Geräte sowie Chemikalien ist im Anhang aufgeführt. Die Reinstoffe NaF und Na₂FPO₃ dienen als Prüfprodukte für alle Versuche. Die Herstellung der Lösungen erfolgte in verschiedenen Konzentrationen und mit unterschiedlichen pH-Werten. Die Konzentrationen werden stets in ppm (parts per million) angegeben und beziehen sich auf die Fluoridkonzentration. Vor dem Einsatz wurden alle Lösungen steril filtriert. Eine Übersicht aller verwendeten fluoridhaltigen Substanzen ist in Tabelle 3-1 dargestellt. Als Kontrolle diente steriles destilliertes Wasser (*aqua dest.*), dessen pH-Wert ebenfalls variiert wurde.

Tabelle 3-1: Übersicht der fluoridhaltigen Lösungen und Kontrolllösungen

Lösung	pH	Konzentration (ppm)
<i>aqua dest.</i>	5,7	-
	5,4	-
NaF	5,4	10.000
		1000
	6,3	10.000
	9,8	10.000
Na ₂ FPO ₃	6,0	10.000

3.1.1 Herstellung der Lösungen

Natriumfluorid

Die NaF-Lösung wurde aus 2,21 g NaF *ad* 100 ml *aqua dest.* zu einer Konzentration von 10.000 ppm angesetzt. Der resultierende pH-Wert betrug 9,8. Um den pH-Wert auf 5,4 zu senken wurde 37,5%iges HCl hinzugefügt.

Eine Lösung mit einem pH-Wert von 6,3 wurde durch das Hinzufügen von 0,2%igen HCl erzeugt.

Zur Verdünnung auf 1000 ppm wurde *aqua dest.* zugesetzt.

Natriummonofluorophosphat

Die Na₂FPO₃-Lösung wurde aus 7,58 g Na₂FPO₃ *ad* 100 ml *aqua dest.* zu der Konzentration 10.000 ppm angesetzt. Der resultierende pH-Wert betrug 6,0.

Kontrolllösung Wasser (aqua dest.)

Zur Kontrolle diente *aqua dest.* mit einem pH-Wert von 5,7. Ein pH-Wert von 5,4 wurde durch Hinzufügen von 0,2%igen HCl erzeugt.

3.2 Probenmaterial

Für die Durchführung der Versuche wurden Prüfkörper benötigt, auf denen eine Fluoridschicht gebildet werden kann. Dafür eignen sich am besten Prüfkörper aus Zähnen, die entsprechend bearbeitet wurden.

3.2.1 Prüfkörperherstellung

Als Probenmaterial für die Schmelzprüfkörper wurden aus Rinderköpfen kariesfreie, bleibende Incisivi extrahiert. Der Schlachthof Zweibrücken stellte die Köpfe der frisch geschlachteten Rinder mit einem Durchschnittsalter von etwa zwei Jahren für die experimentelle Forschung bereit.

Nach einer mechanischen Reinigung der Zahnkronen wurden diese mittels einer wassergekühlten, ultrafeinen Diamanttrennscheibe von der Zahnwurzel getrennt. Anschließend erfolgte eine Abtrennung der oralen Flächen. Die verbliebenen Labialflächen wurden bis zur weiteren Verwendung in einer 0,1%igen Thymollösung im Kühlschrank gelagert.

Die Labialflächen der Zahnkronen wurden unter Verwendung eines Nassschleifgeräts zu standardisierten Schmelzprüfkörpern mit einer Größe von ca. 4 x 4 x 1,5 mm und einer rechteckigen Form geschliffen. Alle Prüfkörper wiesen dabei die Proportionen von einer 2/3 Schmelz- und 1/3 Dentinschicht auf.

Die Oberfläche des Schmelzes wurde bei einer Umdrehungszahl von 350 min⁻¹ unter kontinuierlicher Wasserkühlung mit Silikonkarbonschleifpapier bis zu einem Körnungsgrad von 2500 hochglanzpoliert.

Die Qualitätskontrolle der Prüfkörper erfolgte mit dem Auflichtmikroskop bei 12-facher Vergrößerung. Es wurde hierbei besonders darauf geachtet, dass der Schmelz eine regelmäßig polierte Oberfläche aufwies. Prüfkörper mit Verfärbungen und Unregelmäßigkeiten wurden verworfen. Auch die fertigen Prüfkörper wurden zur Lagerung in einer 0,1%igen Thymollösung im Kühlschrank gelagert.

3.2.2 Prüfkörperreinigung

Bevor die Prüfkörper zu experimentellen Zwecken verwendet werden konnten, wurden sie nach einem standardisierten Verfahren gereinigt. Der erste Schritt war eine dreiminütige Reinigung in einer 3%igen NaOCl-Lösung. Als nächstes kamen die Prüfkörper in ein Sieb unter fließendes demineralisiertes Wasser bis kein NaOCl-Geruch mehr wahrnehmbar war. Danach wurden sie 5 min in einem Ultraschallbad bei 5°C gesäubert. Es folgte eine 15-minütige Inkubation in einer 70%igen Isopropanol-Lösung, bevor sie anschließend dreimal mit sterilem *aqua dest.* gereinigt wurden. Bis zur Versuchsdurchführung wurden die Prüfkörper in sterilem *aqua dest.* für mindestens 6 Stunden bis maximal 3 Tage im Kühlschrank gelagert.

3.3 Herstellung der Trageschienen

Zur Gewinnung von humaner Pellikel wurden Trageschienen angefertigt. Dazu wurde der Oberkiefer von vier Probanden mit Alginat abgeformt, um anschließend Arbeitsmodelle mit Superhartgips Klasse IV daraus herzustellen.

Mittels eines thermoplastischen Tiefziehverfahrens wurden Miniplastikschienen aus hartelastischen, transparenten Duran®-Folien hergestellt. Die Trageschienen umfassten die Eckzähne, die Prämolaren und die Molaren. Zum besseren Halt der Proben wurden die Schienen bukkal und palatinal angeraut und mit Perforationen von ca. 1 mm Durchmesser versehen. Die Trageschienen wurden vor Gebrauch für 10 min in 70%igem Isopropanol gereinigt. Unter Verwendung des Abformsilikons President light body wurden die Prüfkörper an den Schienen befestigt.

Insgesamt wurden, je nach Experiment, zwischen zwei und acht Prüfkörper pro Schiene bukkal angebracht (siehe Abb. 3-2a und 3-2b). Die Proben wurden in die noch formbare Silikonmasse mit Hilfe einer desinfizierten Pinzette platziert und mit einem Zahnstocher in die richtige Endposition gebracht. Die Schmelzoberfläche blieb dabei stets unbedeckt von Silikon und war zur Mundhöhle hin gewandt. Eventuelle Überschüsse der Silikonmasse wurden mit einem Skalpell entfernt, um einen besseren Tragekomfort gewährleisten zu können.

Um eine optimale Vergleichbarkeit sicherzustellen, wurden im ersten Quadranten Prüfkörper für die Versuche mit der 3 min-Pellikel und im zweiten Quadranten für den 2 h-Pellikel platziert.

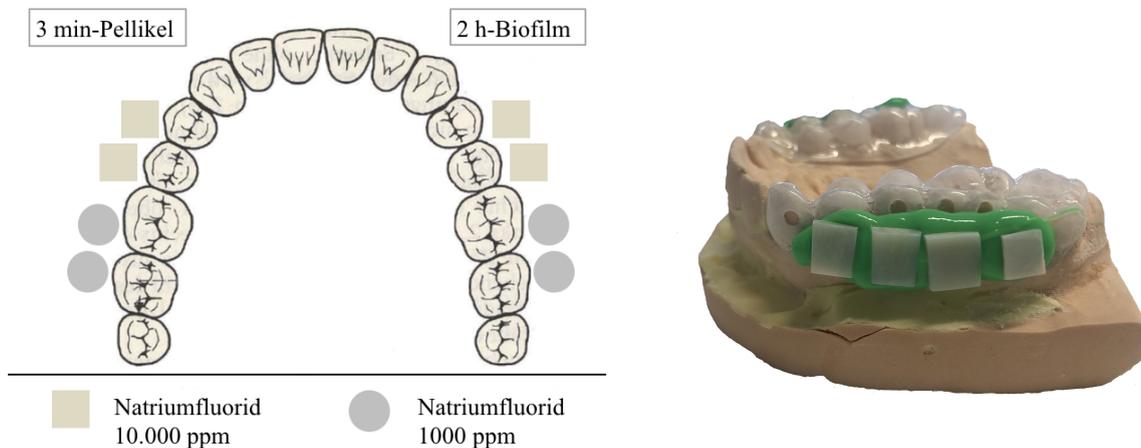


Abb. 3-2a: Schematische Anordnung der Prüfkörper

Abb. 3-2b: Beispiel einer mit Prüfkörpern bestückten Schiene

(Abbildung des Zahnbogens modifiziert nach Lehmann und Hellwig (1998))

3-2a: Im ersten Quadranten wurden Prüfkörper für die 3 min-Pellikel auf der Trageschiene fixiert. Im Prämolarenbereich befanden sich Prüfkörper, die nach Pellikelbildung mit 10.000 ppm haltigen NaF inkubiert wurden, im Molarenbereich befanden sich Prüfkörper, die nach Pellikelbildung mit 1000 ppm haltigen NaF inkubiert wurden. Im zweiten Quadranten wurden Prüfkörper für die 2 h-Pellikel auf der Trageschiene fixiert, im Prämolarenbereich befanden sich Prüfkörper, die nach Pellikelexposition mit 10.000 ppm haltigen NaF inkubiert wurden, im Molarenbereich befanden sich Prüfkörper, die nach Pellikelexposition mit 1000 ppm haltigen NaF inkubiert wurden.

3.4 Probanden

Um den Pellikeleinfluss auf die Bildung von Fluoriddeckschichten zu untersuchen, wurden insgesamt vier Probanden, davon zwei weibliche und zwei männliche, ausgewählt. Die Probanden waren zu dem Zeitpunkt zwischen 24 und 36 Jahre alt. Keiner der Probanden wies allgemein-anamnestische Erkrankungen auf oder nahm regelmäßig Medikamente ein. Die Gebisse waren kariesfrei, vollbezahnt und suffizient konservierend versorgt. Ebenfalls

konnten keine Entzündungszeichen der Mundschleimhaut oder des Parodonts bei der intraoralen Untersuchung festgestellt werden. Die Probanden unterschrieben eine Einverständniserklärung für die Versuchsdurchführung. Eine Zustimmung der Ethikkommission wurde unter der Nummer 238/03 für die Durchführung der Studie eingeholt.

3.5 Versuchsaufbau

Der Ablauf aller Versuche ist in der Abbildung 3-3 in Form eines Flussdiagramms dargestellt.

3.5.1 *In-vitro*-Experimente

Während der *In-vitro*-Versuchsreihe wurde die Bildung von Fluoriddeckschichten auf dem Schmelz durch Applikation NaF und Na₂FPO₃ untersucht. NaF wurde in Konzentrationen von 10.000 ppm (n=42) und 1000 ppm (n=6) getestet. Des Weiteren wurden auch Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten miteinander verglichen. Der anfangs basische pH-Wert von 9,8 wurde auf 6,3 und 5,4 mittels HCl abgesenkt. Na₂FPO₃ wurde mit einer Konzentration von 10.000 ppm (n=10) untersucht. Die Abhängigkeit vom pH-Wert wurde im Gegensatz zu NaF nicht betrachtet. Die zuvor gereinigten Prüfkörper wurden mit einem Papierwisch Tuch getrocknet und in eine 24 well-Zellkulturplatte gegeben. Standardisiert wurde 1 ml der jeweiligen fluoridhaltigen Lösung hinein pipettiert und für 5 min bei 20 °C Raumtemperatur inkubiert. Die Persistenz wurde mittels unterschiedlichen Reinigungsprotokollen getestet. Die bovinen Schmelzprüfkörper wurden im ersten Reinigungsprotokoll 5 s lang in *aqua dest.* in eine Schale getaucht. Weitere Prüfkörper wurden intensiver gewaschen, indem sie für eine Stunde in *aqua dest.* gelagert wurden. Das letzte Reinigungsprotokoll umfasste die Lagerung in *aqua dest.*, welches alle 5 min für insgesamt sechs Mal ausgetauscht wurde. Die Kontrollprüfkörper wurden 5 min in *aqua dest.* gelagert. Alle Prüfkörper wurden nach der Reinigung auf ihrer Dentinseite mit einem Papierwisch Tuch getrocknet, in eine neue 24 well-Zellkulturplatte hineingegeben und unter dem Abzug bis zum nächsten Tag getrocknet. Die Visualisierung der Fluoriddeckschichten erfolgte mittels hochauflösender

Rasterelektronenmikroskopie (REM) und die atomare Analyse der generierten Schichten wurde mit Hilfe der Energiedispersiven Röntgenspektroskopie (EDX) durchgeführt.

3.5.2 *Ex-situ*-Experimente

Der Einfluss der Pellikel auf die Ausbildung von Fluoriddeckschichten wurde für NaF bei einem pH-Wert von 5,4 betrachtet. Untersucht wurden die Konzentrationen 10.000 ppm (n=57) und 1000 ppm (n=30). Die auf Schienen befestigten Prüfkörper wurden entweder für 3 min oder 2 h von insgesamt vier Probanden oral exponiert. Während dieser Zeit durften die Probanden nichts essen oder trinken und sich keine fluoridhaltigen Substanzen zuführen. Im Anschluss wurden die Prüfkörper ebenfalls für 5 min in NaF in Zellkulturplatten inkubiert, indem 1 ml NaF hinzugefügt wurde. Die Kontrollgruppe bestand aus Prüfkörpern, die zuvor ebenfalls oral exponiert und anschließend 5 min in *aqua dest.* gelagert wurden. Die Reinigungsprotokolle, die Lagerung und die Analyse der Prüfkörper waren äquivalent zur *In-vitro*-Untersuchung.

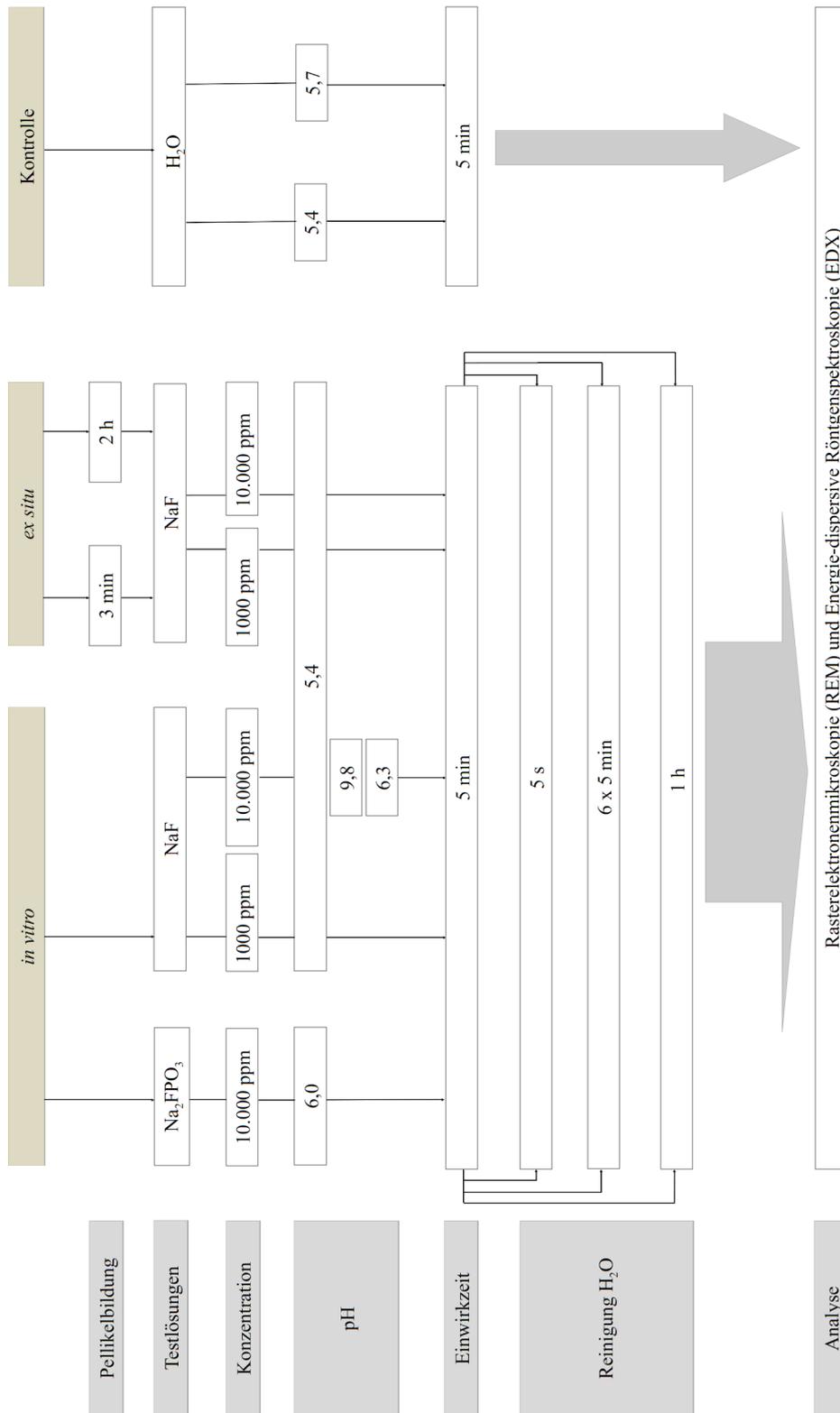


Abb. 3-3: schematischer Versuchsaufbau

3.5.3 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Die Schmelzoberfläche von insgesamt 145 Prüfkörpern wurde rasterelektronenmikroskopisch analysiert. Nach Durchführung der jeweiligen Experimente wurden alle Proben für mindestens 12 Stunden unter dem Abzug luftgetrocknet. Die Prüfkörper wurden mit leitfähigen Tabs auf Proben Tellern aus Aluminium fixiert. Die Prüfkörper wurden unter Vakuum mit Kohlenstoff mittels eines Sputter-Coaters beschichtet. Die Analyse der Prüfkörper erfolgte standardisiert bei verschiedenen Vergrößerungen (25 bis 20.000-fach) mithilfe des Rasterelektronenmikroskops. Repräsentative Bereiche wurden ausgewählt und in den oben genannten Vergrößerungen aufgenommen.

3.5.4. Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Die Energiedispersive Röntgenspektroskopie ist eine Messmethode, um Aufschluss über die Elementzusammensetzung einer Probe zu erhalten. Sie erlaubt zum einen eine qualitative Analyse über die Elemente der Probe und zum anderen eine quantitative Analyse der relativen atomaren Zusammensetzung der Probe.

In der quantitativen Analyse werden drei Kategorien unterschieden: die Hauptelemente haben einen Massenanteil über 10 %, die Nebenelemente einen Massenanteil unter 10 % und vernachlässigbar sind die Elemente unter einem Massenanteil von 1 %. Auf die Probe wird ein Elektronenstrahl mit einer Energie von 10 kV übertragen, wodurch ein Elektron aus seiner Schale herausgeschlagen wird. Dieser instabile Zustand wird durch das Auffüllen der entstandenen Elektronenlücke aus einer höheren Schale beendet. Es entsteht eine Differenz in Form eines Röntgenquants. Jedes Element hat seine charakteristische ausgestrahlte Energie, die auf der x-Achse des resultierenden EDX-Spektrums in keV repräsentiert wird. Die y-Achse zeigt die Signalintensität in cps (counts per second) an. Die Zählung der jeweiligen herausgeschlagenen Elektronen gibt somit Aufschluss über die Zusammensetzung der Probe. Dabei ist die cps-Rate nicht notwendigerweise proportional zu den prozentualen Massenanteilen, da es keinen einfachen Umrechnungsfaktor gibt. Eine Umrechnung ist instrumentenspezifisch und wird daher von den Instrumenten selbst durchgeführt. Die Eindringtiefe des Elektronenstrahls ist von der Beschleunigungsenergie abhängig, bei einer Energie von 10 kV kann der Strahl bis zu 5 µm in die Probe eindringen. Jeder Prüfkörper

wurde bei einer 5000-fachen Vergrößerung für 120 s untersucht. In den dazugehörigen Tabellen finden sich die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Analysen wieder.

3.5.5 Blockface-Imaging-Verfahren

Um Aufschluss über die Zusammensetzung der Globuli zu erhalten, wurde das Blockface-Imaging-Verfahren in Kombination mit EDX angewendet. Für diese Prüfkörper erfolgte eine Inkubation für 5 min in NaF und anschließend eine Reinigung in *aqua dest.* für eine Stunde. Das NaF hatte eine Konzentration von 10.000 ppm und einen pH-Wert von 5,4. Der Prüfkörper wurde in Araldit fixiert. Dazu wurde ein Araldit-Aceton-Gemisch in dem Verhältnis 1:1 angesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur unter dem Abzug gelagert. Am 2. Tag wurde das Gemisch in reines Araldit umgesetzt und ebenfalls über Nacht gelagert. Für die darauffolgenden zwei Tage erfolgte die Auspolymerisierung bei 65°C im Brutschrank. Anschließend wurde der eingebettete Prüfkörper im Bereich der Fluoriddeckschicht mit einem Diamantmesser durchgeschnitten und für die REM- und EDX-Analysen vorbereitet.

4 Ergebnisse

4.1. *In-vitro*-Experimente

Im ersten Abschnitt der Studie wurden *In-vitro*-Experimente mit unterschiedlichen fluoridhaltigen Lösungen durchgeführt. Dabei variierten die Fluoridkonzentration und der pH-Wert der jeweiligen Lösung. Zum einen wurde Na_2FPO_3 mit einem pH von 6,0 und einer Konzentration von 10.000 ppm verwendet, zum anderen kam NaF mit drei unterschiedlichen pH-Werten (pH= 9,8 / 6,3 / 5,4) sowie zwei verschiedenen Konzentrationen (10.000 und 1000 ppm) zum Einsatz. Unterschiedlich intensive Reinigungsprotokolle mit *aqua dest.* (5 s, 1 h, 6 x 5 min) sollten Aufschluss über die Beständigkeit der generierten Fluoriddeckschichten liefern. Eine Kontrolle erfolgte durch Prüfkörper, die lediglich für 5 min in *aqua dest.* inkubiert und danach keiner Reinigung mehr unterzogen wurden. Die Auswertung der *In-vitro*-Ergebnisse erfolgte rasterelektronenmikroskopisch. Es wurden repräsentative Bereiche ausgewählt und in den Vergrößerungen 25- bis 20.000-fach mikroskopiert. Zusätzlich wurden EDX-Analysen durchgeführt. Besonderes Augenmerk galt dabei dem Fluoridgehalt der jeweiligen Proben. Die Ergebnisse der einzelnen Experimente werden im Folgenden exemplarisch für jeweils einen repräsentativen Prüfkörper der jeweiligen Versuchsreihe durch REM-Bilder (5000-fache Vergrößerung) sowie EDX-Analysen veranschaulicht.

Na_2FPO_3 und NaF wurden in Bezug auf die Beständigkeit der generierten Fluoriddeckschichten sowie die Homogenität der Verteilung von CaF_2 -Globuli auf dem Zahnschmelz miteinander verglichen. Im weiteren Verlauf wurde der Einfluss des pH-Werts für NaF untersucht. Ebenfalls entscheidend für eine umfassende Beurteilung der Stabilität der Fluoriddeckschichten war eine Variation der Konzentrationen im Falle des NaF.

4.1.1 Kontrolle mit *aqua dest.*

Als Kontrolle diente *aqua dest.* mit einem pH-Wert von 5,73. Die Prüfkörper wurden lediglich für die Inkubationszeit von 5 min in *aqua dest.* gelagert und anschließend analysiert. In Abb. 4-1 ist keine Fluoriddeckschicht sichtbar. Ebenso war der Fluoridgehalt unter der Nachweisgrenze von 1 %.

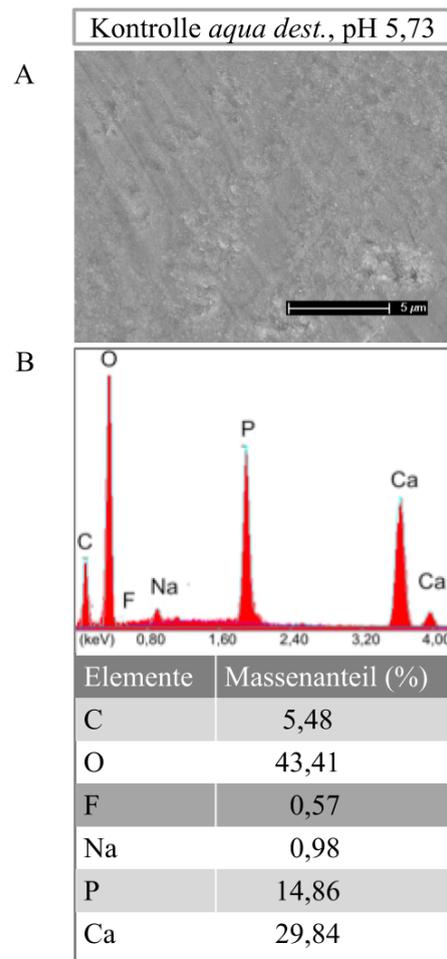


Abb. 4-1: Kontrolle: *aqua dest.* mit einem pH-Wert von 5,73

Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz wurde für 5 min in *aqua dest.* inkubiert, anschließend getrocknet und mikroskopiert

A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme bei 5000-facher Vergrößerung

B) Energiedispersive-Röntgenanalyse und Tabelle der Massenanteile der aufgeführten Elemente

Eine Kontrolle mit *aqua dest.* erfolgte ebenfalls für einen pH-Wert von 5,4. Dies diente als Kontrolle für die Versuchsreihe NaF mit einem pH-Wert von 5,4 (Vergleich Abb. 4-6). In Abb 4-2 ist ebenfalls keine Fluoriddeckschicht sichtbar. Auch für diese Prüfkörper konnte erwartungsgemäß kein Fluorid nachgewiesen werden.

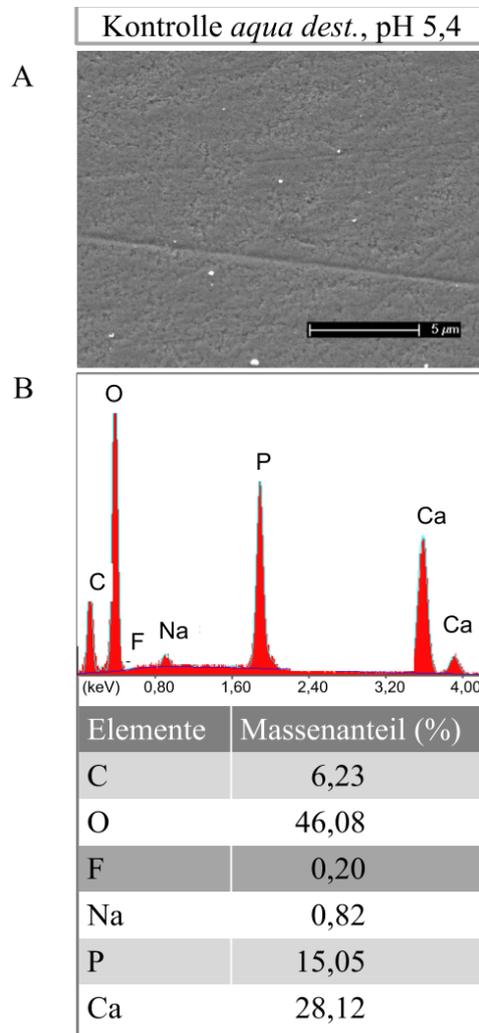


Abb. 4-2: Kontrolle: *aqua dest.* mit einem pH-Wert von 5,4

Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz wurde für 5 min in *aqua dest.* inkubiert, anschließend getrocknet und mikroskopiert

A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme bei 5000-facher Vergrößerung

B) Energiedispersive-Röntgenanalyse und Tabelle der Massenanteile der aufgeführten Elemente

4.1.2 Natriummonofluorophosphat

Die Na_2FPO_3 -Lösung, hergestellt mit einem pH-Wert von 6,0 und einer Konzentration von 10.000 ppm, ergab nach 5-minütiger Inkubation nur sehr niedrige Fluoridwerte (Abb. 4-3). Der höchste Massenanteil an Fluorid zeigte sich nach 5-sekündiger Reinigung mit *aqua dest.* Nach den beiden intensiven Waschungen wurden für beide Prüfkörper Fluoridmassenanteile unter der Nachweisgrenze gemessen. Auch in den REM-Bildern ist sichtbar, dass keine Fluoridablagerungen vorhanden waren. Folglich ist es nicht möglich unter den gewählten Bedingungen eine stabile Fluoriddeckschicht mit einer Na_2FPO_3 -Lösung zu erzeugen.

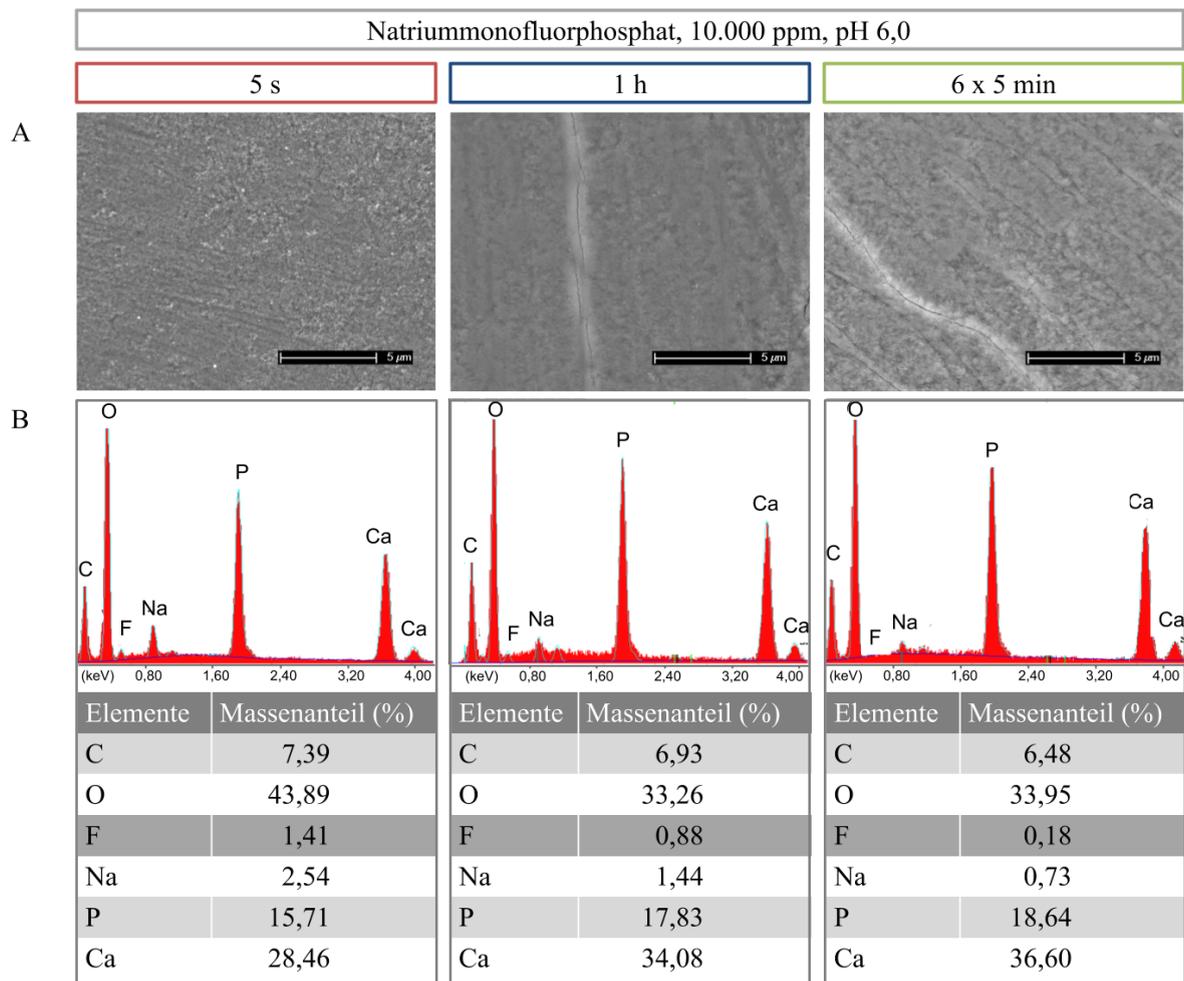


Abb. 4-3: Darstellung der Ergebnisse der Fluoridierung mit Na_2FPO_3 bei einem pH-Wert von 6,0 und einer Konzentration von 10.000 ppm

Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz wurden für 5 min in Na_2FPO_3 inkubiert, danach 5 s, 1 h oder 6 x 5 min in *aqua dest.* gereinigt und anschließend getrocknet und mikroskopiert

A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, 5000-fache Vergrößerung

B) Energiedispersive-Röntgenanalysen und Tabellen der Massenanteile der aufgeführten Elemente

4.1.3 Natriumfluorid

NaF, 10.000 ppm, pH-Wert 9,8

Als Reinstoff diente NaF mit einer Konzentration von 10.000 ppm und einem pH-Wert von 9,8. In Abb. 4-4 sind die Ergebnisse veranschaulicht worden. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurden niedrige prozentuale Fluoridwerte gemessen, vergleichbar mit Na_2FPO_3 . Der Fluoridgehalt nach der 5-sekündigen Waschung war mit 2,25 % geringfügig höher als bei Na_2FPO_3 . Der Massenanteil für Fluorid nach den intensiven Waschungen war unter der Nachweisgrenze. Auf den REM-Bildern sieht man nach diesen Reinigungsmethoden keine Fluoriddeckschichten. Nach einer 5-sekündigen Reinigung waren mehrere hellere Bereiche sichtbar, die mittels EDX-Analyse zusätzlich vermessen wurden.

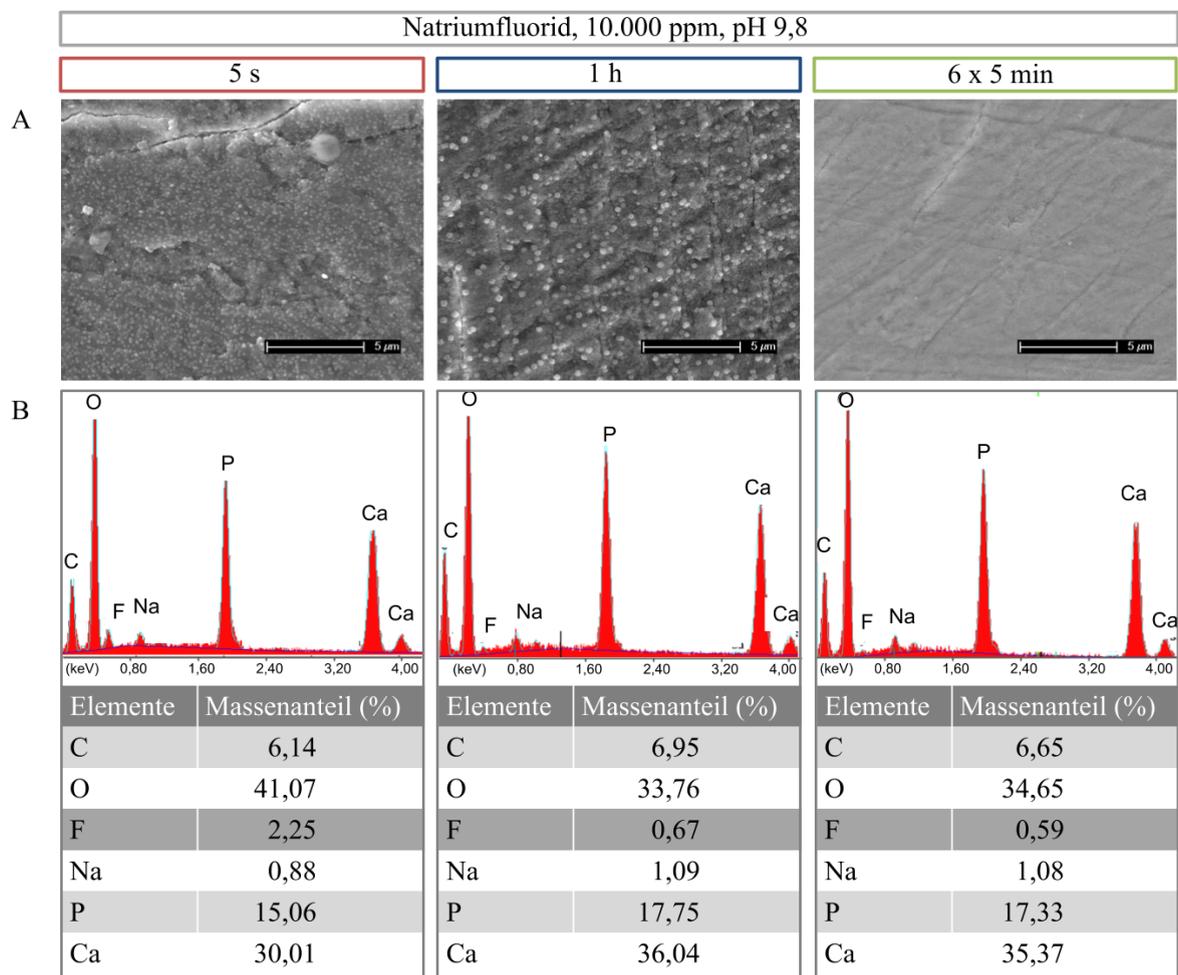


Abb. 4-4: Darstellung der Ergebnisse der Fluoridierung mit NaF bei einem pH-Wert von 9,8 und einer Konzentration von 10.000 ppm

Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz wurden für 5 min in NaF inkubiert, danach 5 s, 1 h oder 6 x 5 min in *aqua dest.* gereinigt und anschließend getrocknet und mikroskopiert

A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, 5000-fache Vergrößerung

B) Energiedispersive-Röntgenanalysen und Tabellen der Massenanteile der aufgeführten Elemente

In den beiden vorliegenden REM-Bildern der Abb. 4-5 sieht man zwei Bereiche, die zusätzlich mittels EDX untersucht wurden. Der Grund dafür ist, dass die Fluoriddeckschicht nicht homogen verteilt war. Diese bestand größtenteils aus dunklen und vereinzelt hellen kugelförmigen Strukturen, die globulär aufgelagert waren. Um zu identifizieren, wie hoch der jeweilige Fluoridgehalt dieser Bereiche war, wurden weitere EDX-Analysen durchgeführt. Die Auswertung zeigt, dass sowohl in den dunklen, als auch in den hellen Bereichen Fluorid vorhanden war. Die hellen Kugeln hatten mit 2,73 % einen geringfügig höheren Fluoridgehalt als die dunklen Bereiche mit einem Anteil von 2,35 %.

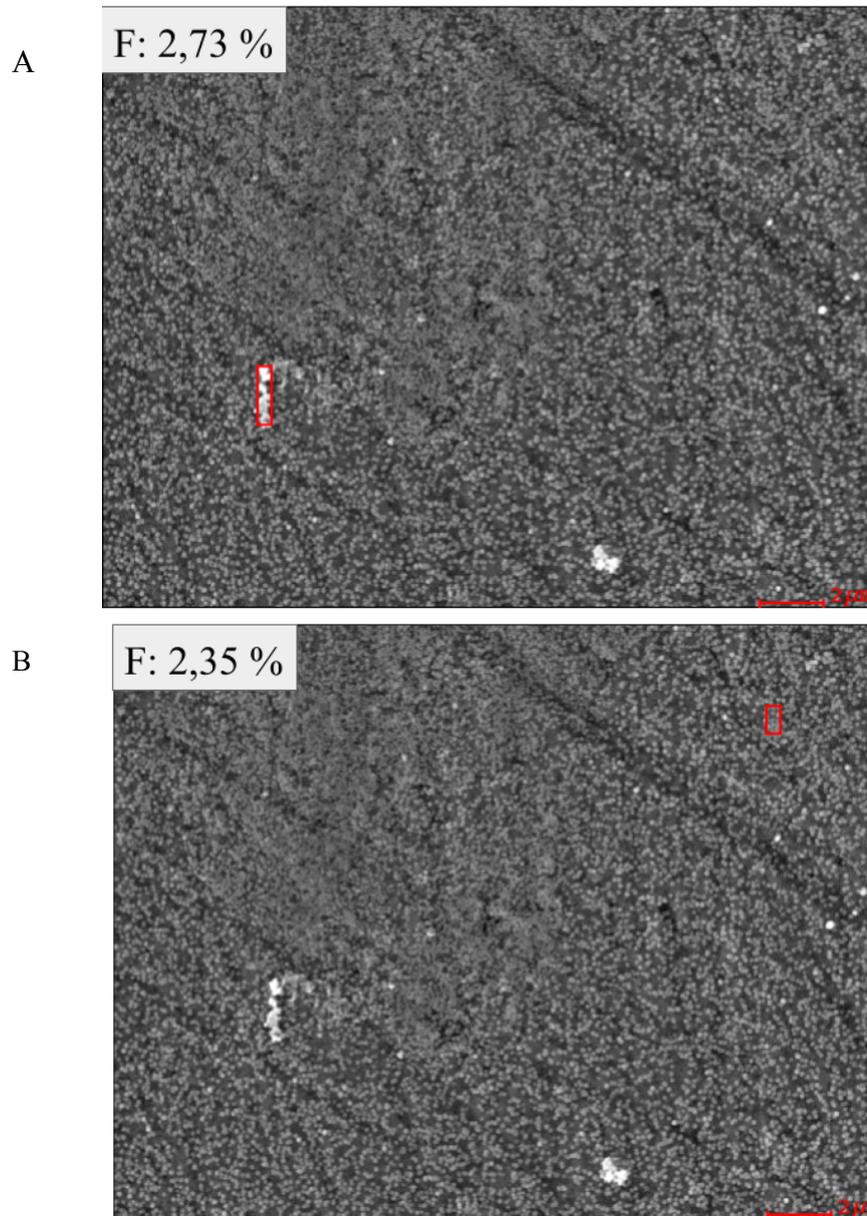


Abb. 4-5: Darstellung der Bereichsmessungen mittels EDX nach Fluoridierung mit NaF bei einem pH-Wert von 9,8 und Konzentration von 10.000 ppm

Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz wurden nach 5-minütiger Inkubation für 5 s in *aqua dest.* gereinigt, Vergrößerung 5000-fach; links oben ist der Massenanteil an F in den rot gekennzeichneten Bereichen abgebildet: A) Messung der hellen Globuli B) Messung der dunklen Globuli

Als Schlussfolgerung ergab sich daraus, dass es grundsätzlich möglich ist, mit NaF reproduzierbare Fluoriddeckschichten zu bilden. Im weiteren Verlauf sollte untersucht werden, inwiefern es möglich ist durch Veränderungen der Konzentration und des pH-Wertes sowohl höhere Fluoridwerte zu erreichen, als auch gleichzeitig die Persistenz der Fluoriddeckschichten zu erhöhen. Deshalb wurde der pH-Wert von 9,8 auf 5,4 erniedrigt. Die Schmelzprüfkörper wurden ebenfalls für 5 min in NaF inkubiert und danach wie zuvor unterschiedlich stark gereinigt.

NaF, 10.000 ppm, pH-Wert 5,4

Die Ergebnisse, dargestellt in Abb. 4-6, des NaFs mit einem pH-Wert von 5,4 unterschieden sich maßgeblich von denen mit einem pH-Wert von 9,8. Für alle drei Waschmethoden konnte sowohl Fluorid nachgewiesen, als auch eindeutig eine homogene Fluoriddeckschicht gebildet werden. Hier zeichnet sich die Tendenz ab, dass nach kurzer Reinigung für 5 s mit aqua dest. die höchsten Fluoridwerte detektiert werden. Nach der einstündigen Reinigung mit aqua dest. war eine Fluoriddeckschicht mit einem Massenanteil von 6,78 % nachweisbar. Als die intensivste Waschmethode erwies sich das wiederholende Austauschen von aqua dest. nach 5 Minuten für insgesamt sechs Mal. Dabei ergab sich ein Fluoridmassenanteil von 5,05 %.

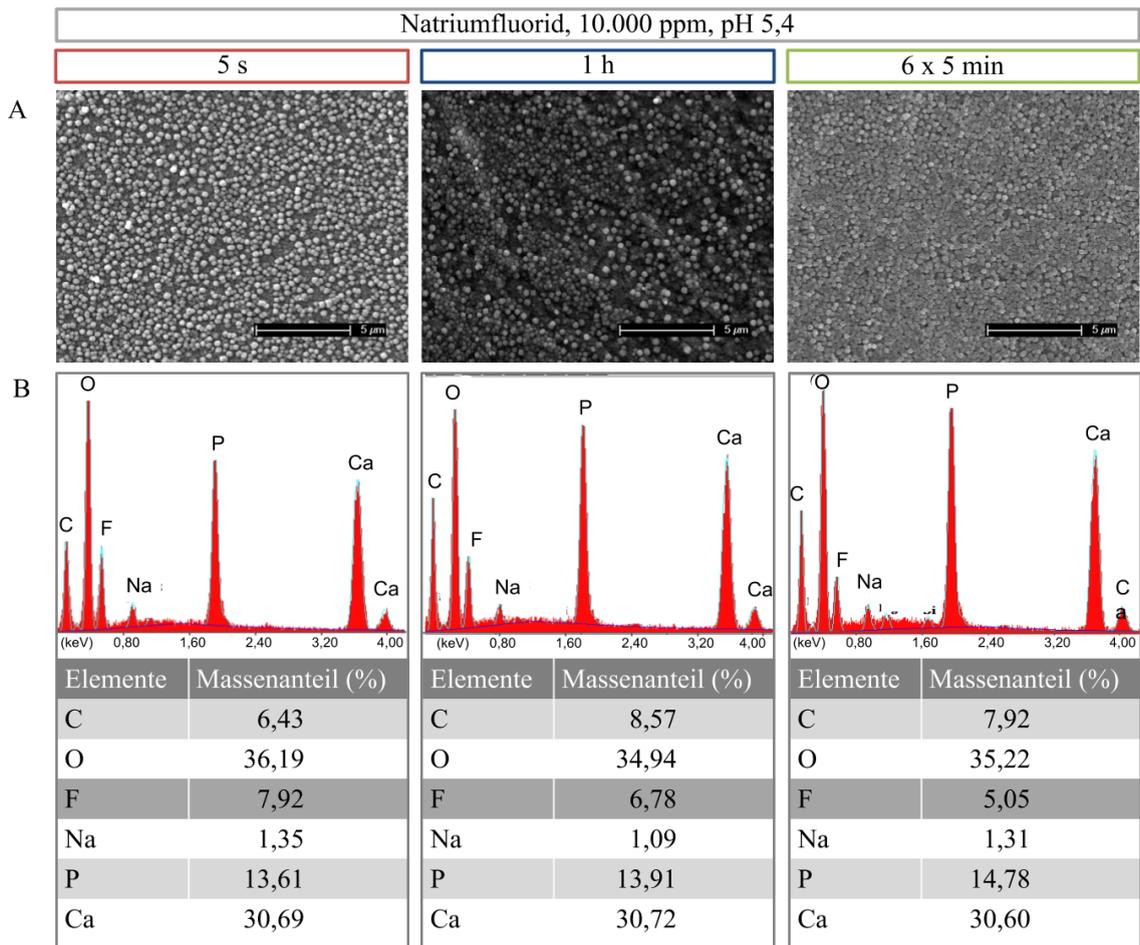


Abb. 4-6: Darstellung der Ergebnisse der Fluoridierung mit NaF bei einem pH-Wert von 5,4 und einer Konzentration von 10.000 ppm

Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz wurden für 5 min in NaF inkubiert, danach 5 s, 1 h oder 6 x 5 min in *aqua dest.* gereinigt und anschließend getrocknet und mikroskopiert

A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, 5000-fache Vergrößerung

B) Energiedispersive-Röntgenanalysen und Tabellen der Massenanteile der aufgeführten Elemente

EDX-Detailanalysen der homogenen Fluoriddeckschichten sind in Abb. 4-7 dargestellt. Diese bestätigen, dass die regelmäßig verteilten kugelförmigen, globulären Strukturen Fluorid enthielten. Der Massenanteil von 3,22 % bzw. 4,17 % lag über der Nachweisgrenze.

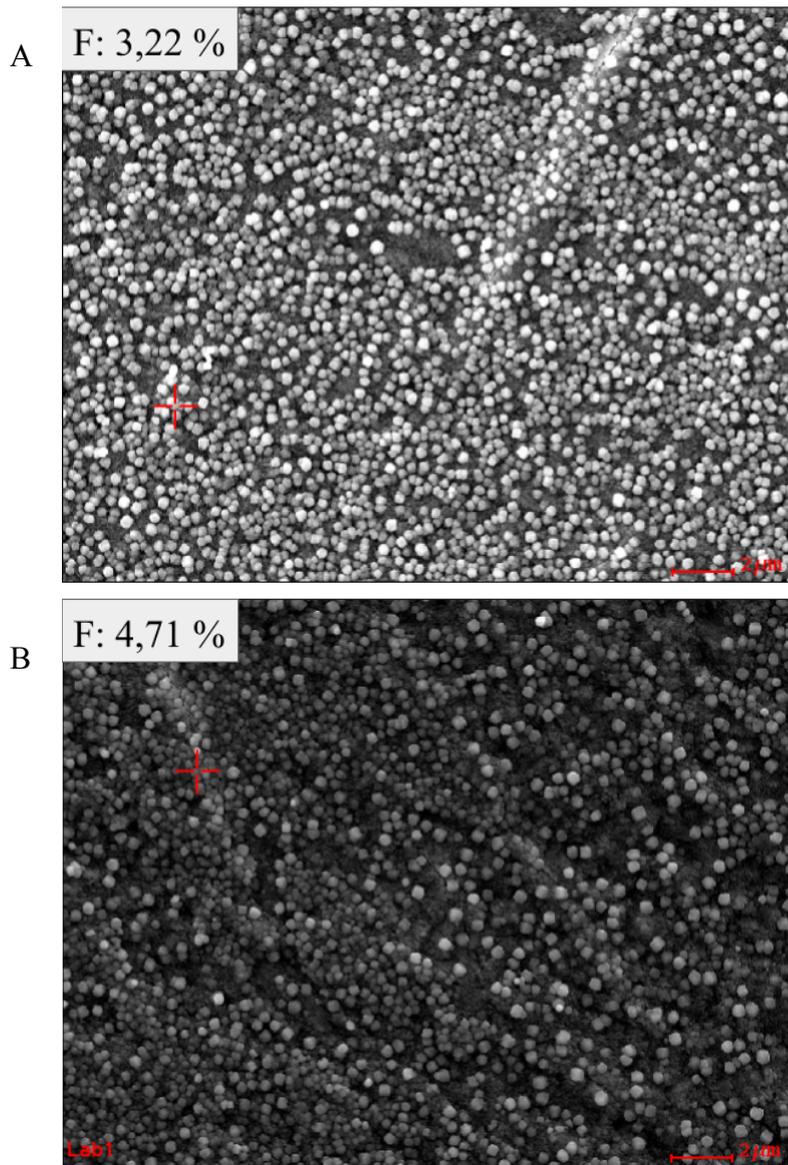


Abb. 4-7: Darstellung der Punktmessungen mittels EDX nach Fluoridierung mit NaF bei einem pH-Wert von 5,4 und Konzentration von 10.000 ppm

Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz wurden nach 5-minütiger Inkubation für 5 s bzw. 1 h in *aqua dest.* gereinigt, Vergrößerung 5000-fach, links oben ist der Massenanteil an F in den rot gekennzeichneten Punkten abgebildet A: Punktmessung nach 5 s *aqua dest.* B: Punktmessung nach 1 h *aqua dest.*

Es war gelungen Fluoriddeckschichten zu erzeugen, die nach allen drei Waschungen detektierbar waren. Die Konsequenz allerdings daraus ist, dass man den Zahnschmelz zunächst mit einem sauren pH-Wert angreifen und somit leicht demineralisieren muss, um danach Fluorid anlagern zu können. Daraus entstand die Fragestellung, ob mit einem weniger sauren pH-Wert ebenfalls eine Fluoridierung möglich wäre. Weiterhin wurde untersucht, ob eine geringere Konzentration ausreicht, um ähnliche Ergebnisse zu erzielen.

NaF, 10.000 ppm, pH-Wert 6,3

Das Vorhaben, eine fluoridierte Schmelzoberfläche zu erzeugen, war mit einer NaF-Lösung mit einem pH-Wert von 5,4 gelungen. Allerdings beginnt Schmelz ab einem pH-Wert von ca. 5,5 zu demineralisieren. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob eine Erzeugung einer Fluoriddeckschicht mit einer NaF-Lösung mit weniger saurem pH-Wert dennoch möglich wäre. Dazu wurde eine NaF-Lösung mit einem pH-Wert von 6,3 eingesetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde sowohl nach 5-sekündigen als auch einstündigen Reinigungen mit *aqua dest.*, eine fluoridierte Oberfläche sichtbar, wie in Abb. 4-8 zu sehen. Im Vergleich zu der NaF-Lösung mit einem pH-Wert von 5,4 war diese nicht homogen ausgeprägt. Nach dem intensiven Wechseln von *aqua dest.* war kein Fluorid mehr in der REM-Aufnahme sichtbar. Sichtbar waren lediglich die Polierspuren auf der Schmelzoberfläche. Die EDX-Analyse zeigte, dass bei den ersten zwei Reinigungen noch Fluorid nachweisbar war, während es bei der dritten Reinigungsmethode nicht mehr detektiert werden konnte.

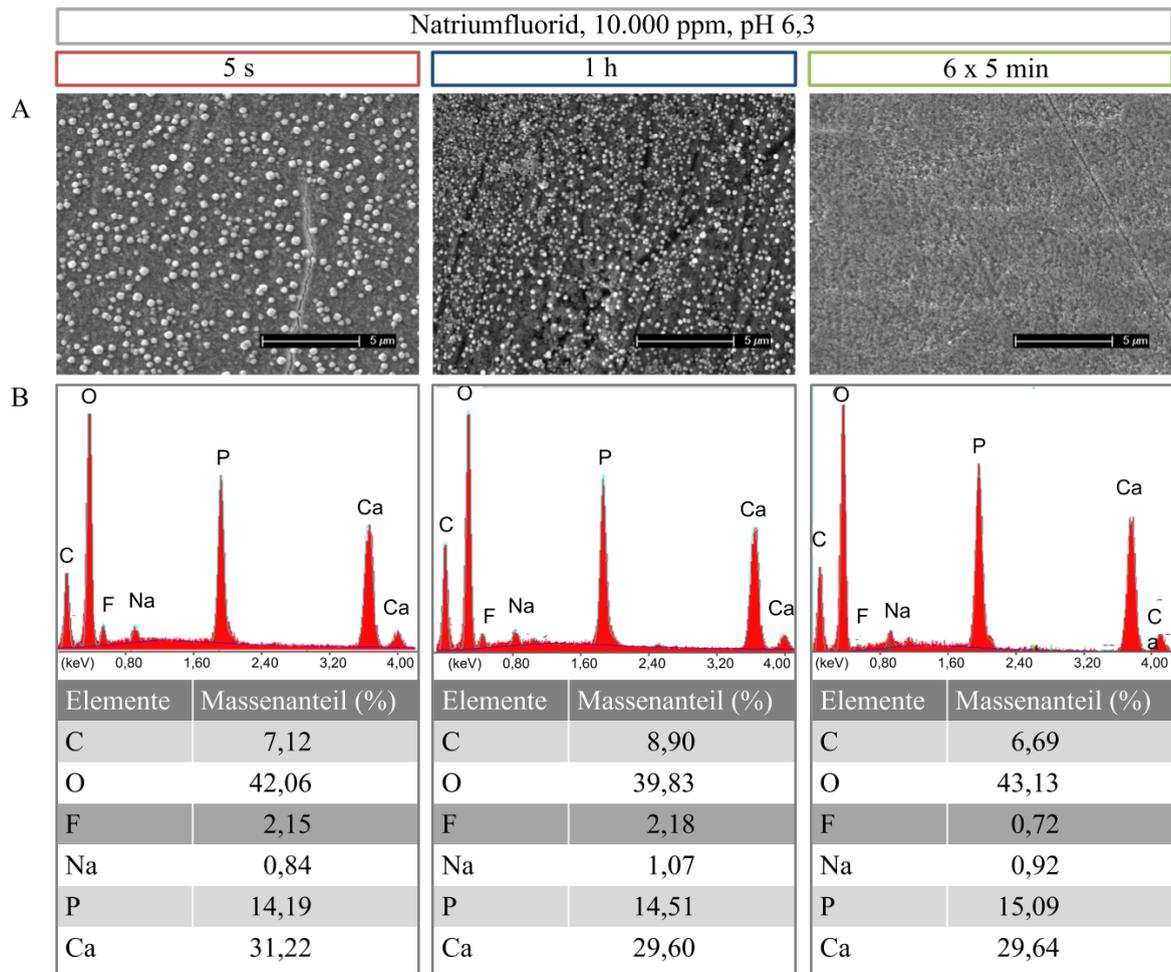


Abb. 4-8: Darstellung der Ergebnisse der Fluoridierung mit NaF bei einem pH-Wert von 6,3 und einer Konzentration von 10.000 ppm

Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz wurden für 5 min in NaF inkubiert, für 5 s, 1 h oder 6 x 5 min in *aqua dest.* gereinigt und anschließend getrocknet und mikroskopiert

A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, 5000-fache Vergrößerung

B) Energiedispersive-Röntgenanalysen und Tabellen der Massenanteile der aufgeführten Elemente

In Abb. 4-9 sind Punktmessungen mittels EDX-Analyse dargestellt. Es zeigt sich, dass die Globuli nach einer 5-sekündigen Waschung noch geringfügig Fluorid enthielten. Nach einer Stunde *aqua dest.* konnte kein Fluorid mehr nachgewiesen werden.

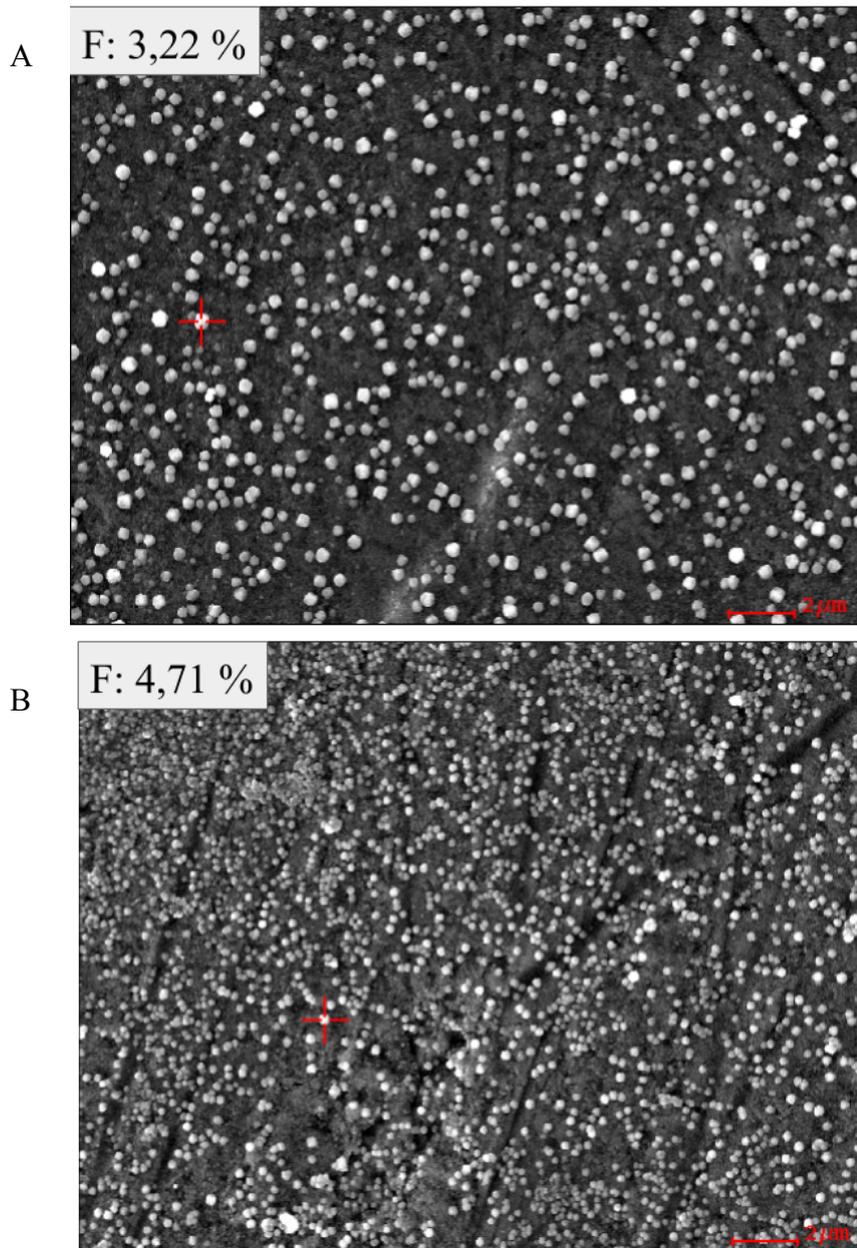


Abb. 4-9: Darstellung der Punktmessungen mittels EDX nach Fluoridierung mit NaF bei einem pH-Wert von 6,3 und Konzentration von 10.000 ppm

Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz wurden nach 5-minütiger Inkubation für 5 s bzw. 1 h in *aqua dest.* gereinigt, Vergrößerung 5000-fach, links oben ist der Massenanteil an F in den rot gekennzeichneten Punkten abgebildet A: Punktmessung nach 5 s *aqua dest.* B: Punktmessung nach 1 h *aqua dest.*

Insgesamt war die Bildung von Fluoriddeckschichten mit der NaF-Lösung mit einem pH-Wert von 6,3 weniger stark ausgeprägt im Vergleich zum pH-Wert von 5,4. Aus diesen Ergebnissen

lässt sich schließen, dass Schmelz zunächst demineralisiert werden muss, bevor Fluoriddeckschichten gebildet werden können.

NaF, 1000 ppm, pH-Wert 5,4

Bei der folgenden Versuchsreihe wurde die Konzentration der NaF-Lösung mit einem pH-Wert von 5,4 auf 1000 ppm reduziert. Es sollte untersucht werden, inwieweit es bei dieser Konzentration immer noch möglich ist Fluoriddeckschichten zu generieren. Die Ergebnisse der EDX-Analyse in Abb. 4-10 zeigten deutlich, dass nach allen drei Reinigungen die Massenanteile für Fluorid unter der Nachweisgrenze lagen. Auch die REM-Bilder zeigten nach 1 h oder 6 x 5 min Reinigung keinerlei Globuli mehr wie zuvor bei 10.000 ppm. Lediglich nach der 5-sekündigen Reinigung in *aqua dest.* waren vereinzelt kugelförmige Strukturen sichtbar. Die Detail-EDX-Analyse (Abb. 4-11) zeigte, dass es sich hierbei nicht um Fluorid handelte, da der Wert mit 0,36 % unter der Nachweisgrenze lag. Auch in einer Punktmessung im dunklen Bereich des Prüfkörpers konnte kein Fluorid nachgewiesen werden.

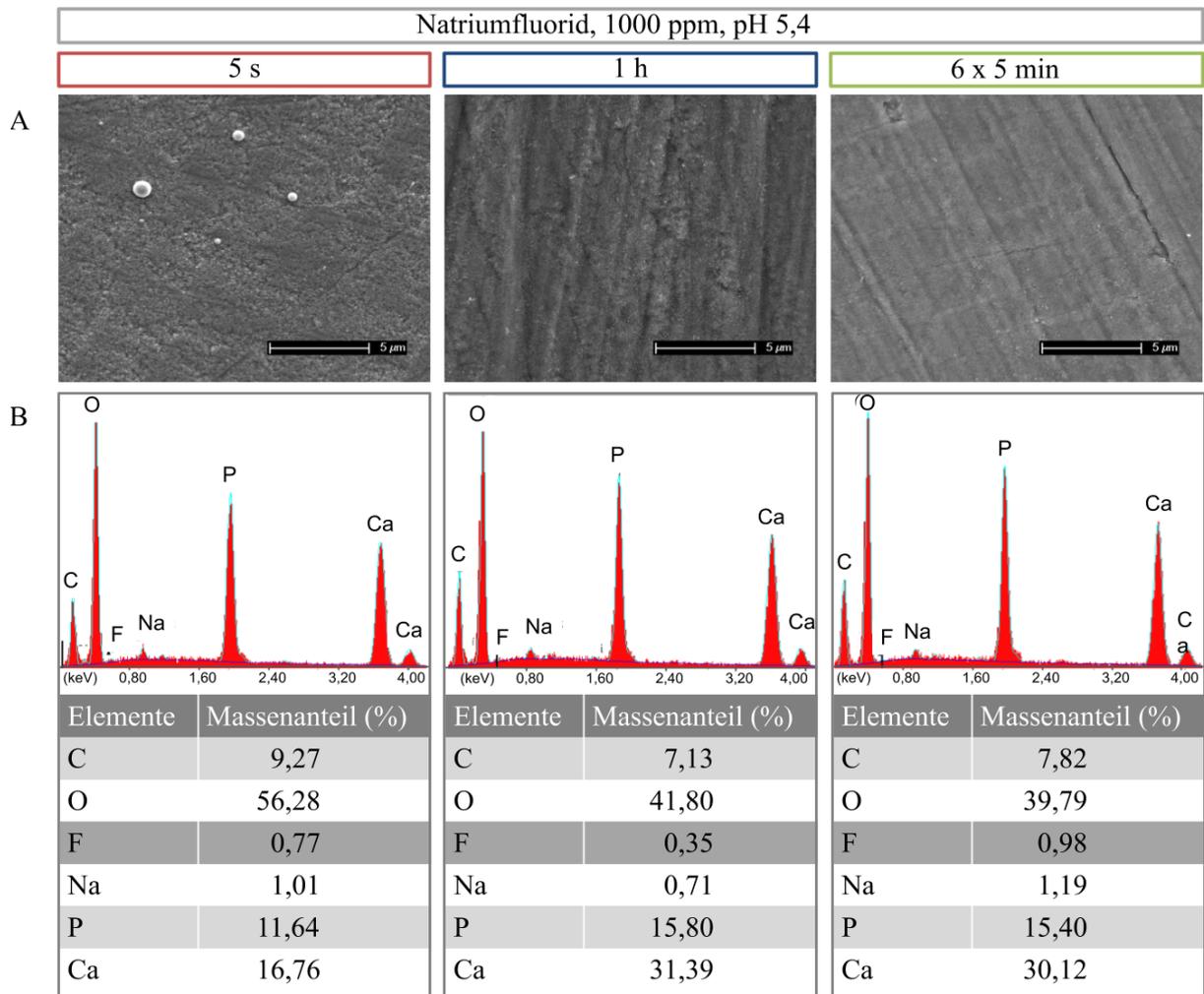


Abb. 4-10: Darstellung der Ergebnisse der Fluoridierung mit NaF bei einem pH-Wert von 5,4 und einer Konzentration von 1.000 ppm

Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz wurden für 5 min in NaF inkubiert, für 5 s, 1 h oder 6 x 5 min in *aqua dest.* gereinigt und anschließend getrocknet und mikroskopiert

A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, 5000-fache Vergrößerung

B) Energiedispersive-Röntgenanalysen und Tabellen der Massenanteile der aufgeführten Elemente

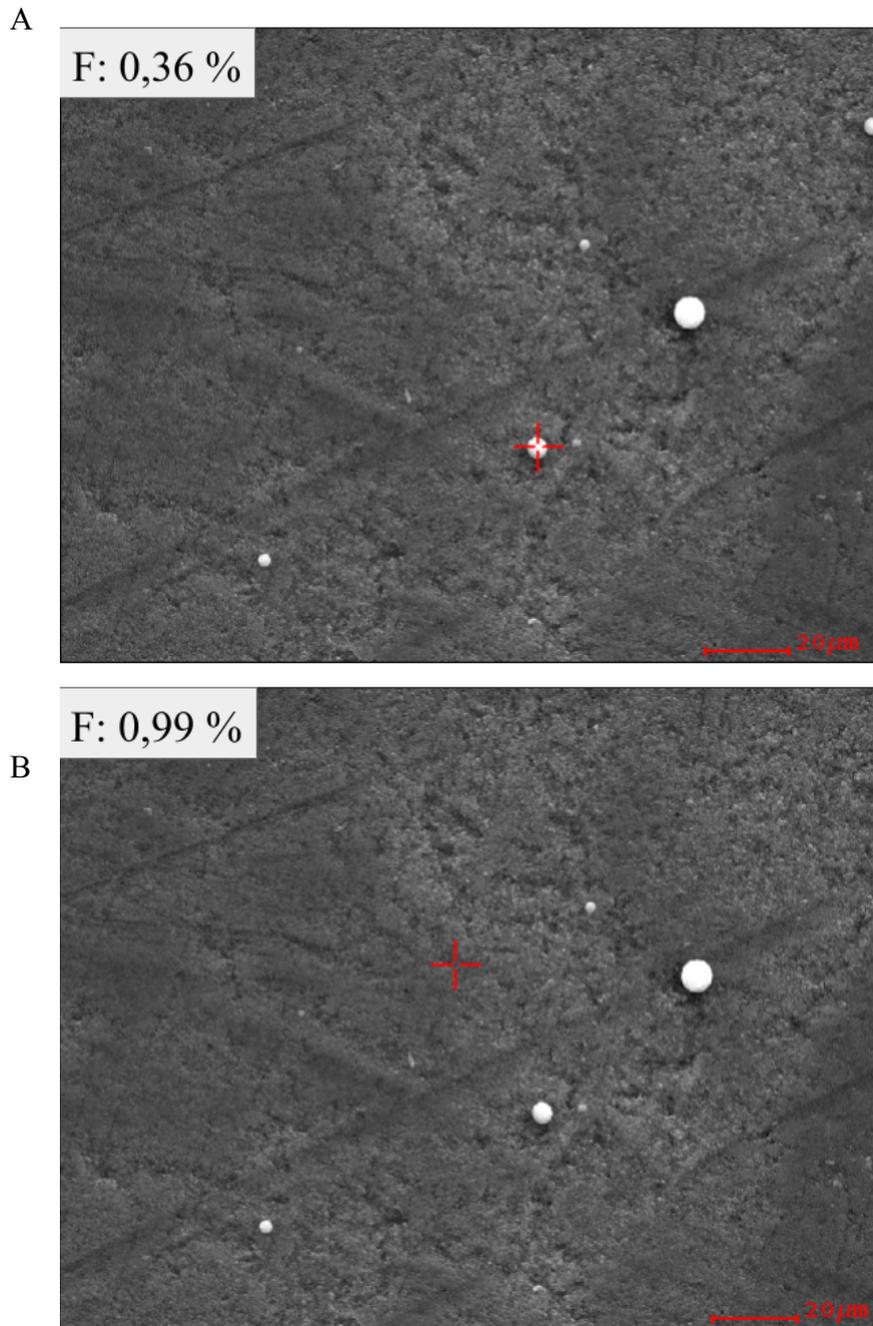


Abb. 4-11: Darstellung der Punktmessungen mittels EDX nach Fluoridierung mit NaF bei einem pH-Wert von 5,4 und Konzentration von 1.000 ppm

Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz wurden nach 5-minütiger Inkubation für 5 s in *aqua dest.* gereinigt wurde, Vergrößerung 5000-fach, links oben ist der Massenanteil an F in den rot gekennzeichneten Punkten abgebildet A: Punktmessung runde, helle Struktur B: Punktmessung dunkler Bereich

Folglich ergibt sich, dass eine Konzentration von 1000 ppm unter den gewählten Bedingungen nicht ausreicht, um eine Fluoriddeckschicht zu bilden.

4.1.4 Übersicht der *In-vitro*-Ergebnisse

Der Vergleich aller Fluoridlösungen in Abb. 4-12 macht deutlich, dass lediglich die hochkonzentrierte (10.000 ppm) und saure (pH=5,4) NaF-Lösung persistente Fluoriddeckschichten erzeugt. Nach allen drei Reinigungen wurden die höchsten Fluoridmassenanteile im Mittelwert gemessen. Die Werte nahmen mit der Intensivierung der Reinigung von 8,06 % (5 s Reinigung), 7,72 % (1 h Reinigung) bis 4,38 % (6 x 5 min Reinigung) ab. Bei der niedrigen Konzentration von 1000 ppm wurde kein Fluorid nachgewiesen. Die Fluoridlösungen mit den pH-Werten 9,8 und 6,3 zeigten, dass nur nach einer 5-sekündigen Waschung geringfügig Fluorid nachweisbar war. Lediglich Spuren von Fluorid waren auch nach der Reinigung für 1 h bei der Lösung mit dem pH-Wert von 6,3 detektierbar. Na₂FPO₃ bildete nur nach kurzer Reinigung Fluoriddeckschichten. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass Schmelz scheinbar leicht demineralisiert werden muss, bevor Fluoriddeckschichten ausgebildet werden können.

Ergebnisse

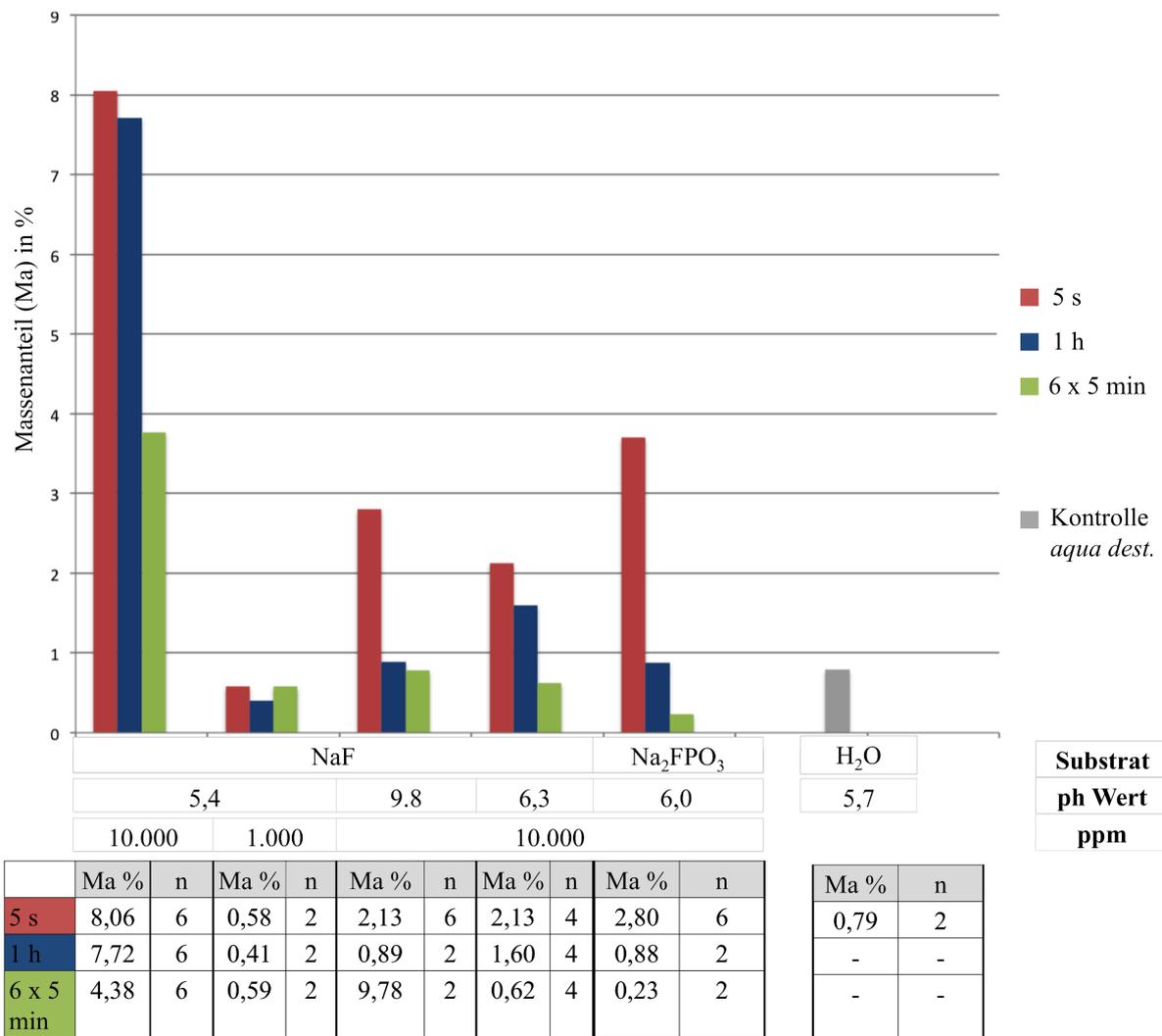


Abb. 4-12: Zusammenfassung der EDX-Analysen aller *In-vitro*-Versuche

Das Diagramm zeigt auf der y-Achse die Mittelwerte der Fluorid-Massenanteile (Ma) in % und auf der x-Achse die Substrate: NaF mit pH-Werten 5,4 / 6,3 / 9,8; sowie von Konzentrationen 10.000 und 1000 ppm, Na₂FPO₃ mit pH-Wert 6,0 und Konzentration von 10.000 ppm und die Kontrolle mit *aqua dest.*

Reinigungsmethoden mit *aqua dest.*: 5s, 1h, 6 x 5min

Anzahl der verwendeten Prüfkörper: n

4.2 Untersuchung der Fluoriddeckschicht und Detektion der Globuli

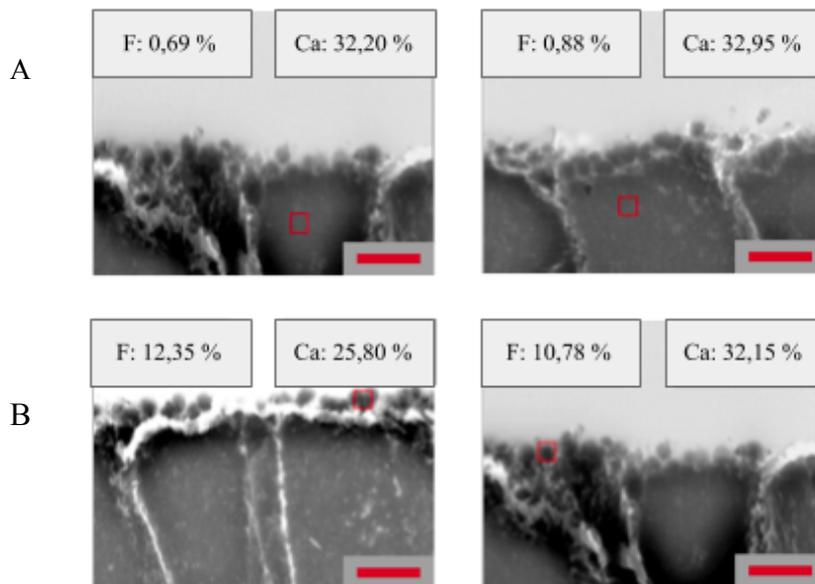


Abb. 4-13: Detektion von Fluorid in unterschiedlichen Tiefen des Schmelzprüfkörpers mittels Energiedispersiver-Röntgenspektroskopie

Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz wurden für 5 min in NaF (pH 5,4) bei 10.000 ppm inkubiert und anschließend erfolgte eine Reinigung für 1 h in *aqua dest.* Man sieht Aufnahmen in verschiedenen Tiefen eines Querschnittspräparates, die rot gekennzeichneten Rechtecke stellen jeweils den Bereich, der gemessen wurde dar. Der rote Balken entspricht 1 µm. Oben links im Bild Fluoridmassenanteil (F), oben rechts im Bild Kalziummassenanteil (Ca)

A) Analyse in tiefen Bereichen des Schmelzes

B) Analyse der oberflächlichen Ablagerungen (Globuli)

In den Flächenpräparaten war es nicht möglich zu detektieren woraus die Globuli zusammengesetzt waren, weil auch Bestandteile des tieferliegenden Schmelzes bei der EDX-Analyse bis zu einer Tiefe von 5 µm mitgemessen wurden. Aus diesem Grund wurden Querschnittpräparate angefertigt, die in Araldit eingebettet wurden. Es wurden sowohl tiefe Bereiche innerhalb des Schmelzes, sichtbar in Abb. 4-13 A), als auch oberflächlich angelagerte Schichten, sichtbar in Abb 4-13 B), analysiert. In der oberflächlich aufgelagerten globulären Schicht wurde neben dem zuvor durch EDX-Oberflächenanalysen detektierten Fluorid hauptsächlich Ca nachgewiesen. Damit steht fest, dass es sich bei den generierten Globuli um CaF_2 -Globuli handelt. Eine weitere Erkenntnis dieser Untersuchung ist, dass nur in den oberflächlich generierten Schichten Fluorid nachgewiesen werden konnte. Es war kein Fluorid in den tiefen Bereichen des Schmelzes nachweisbar. Infolgedessen wurde unter den gewählten Bedingungen Fluorid nur oberflächlich auf den Schmelzprüfkörper aufgelagert.

4.3 *Ex-situ*-Experimente

Nachdem es *in vitro* gelungen war mit NaF bei einem pH von 5,4 homogene und ebenso persistente Fluoriddeckschichten zu erzeugen, sollte untersucht werden inwieweit die Pellikel diese Bildung fördert oder inhibiert. Zum einen wurde eine Kurzzeitpellikel von 3 min untersucht und zum anderen eine Pellikel, die 2 h gebildet wurde. Nach der oralen Exposition des Schmelzprüfkörpers für die jeweiligen Zeiten wurden alle Prüfkörper wie zuvor *in vitro* 5 min in NaF (pH-Wert 5,4) inkubiert. Anschließend wurden die gleichen Reinigungsmethoden wie in den *In-vitro*-Experimenten durchgeführt. Eine Kontrolle wurde sowohl für die 3 min-Pellikel, als auch 2 h-Pellikel durchgeführt.

4.3.1 Kontrolle mit Pellikel und *aqua dest.*

Nach einer intraoralen Exposition für 3 min oder 2 h wurden die Prüfkörper mit *aqua dest.* (pH = 5,73) für 5 min inkubiert. Analog zu den *In-vitro*-Ergebnissen war keine Fluoriddeckschicht sichtbar, wie Abb. 4-14 zeigt. Des Weiteren war der Fluoridgehalt bei beiden Expositionszeiten unter der Nachweisgrenze von 1 %.

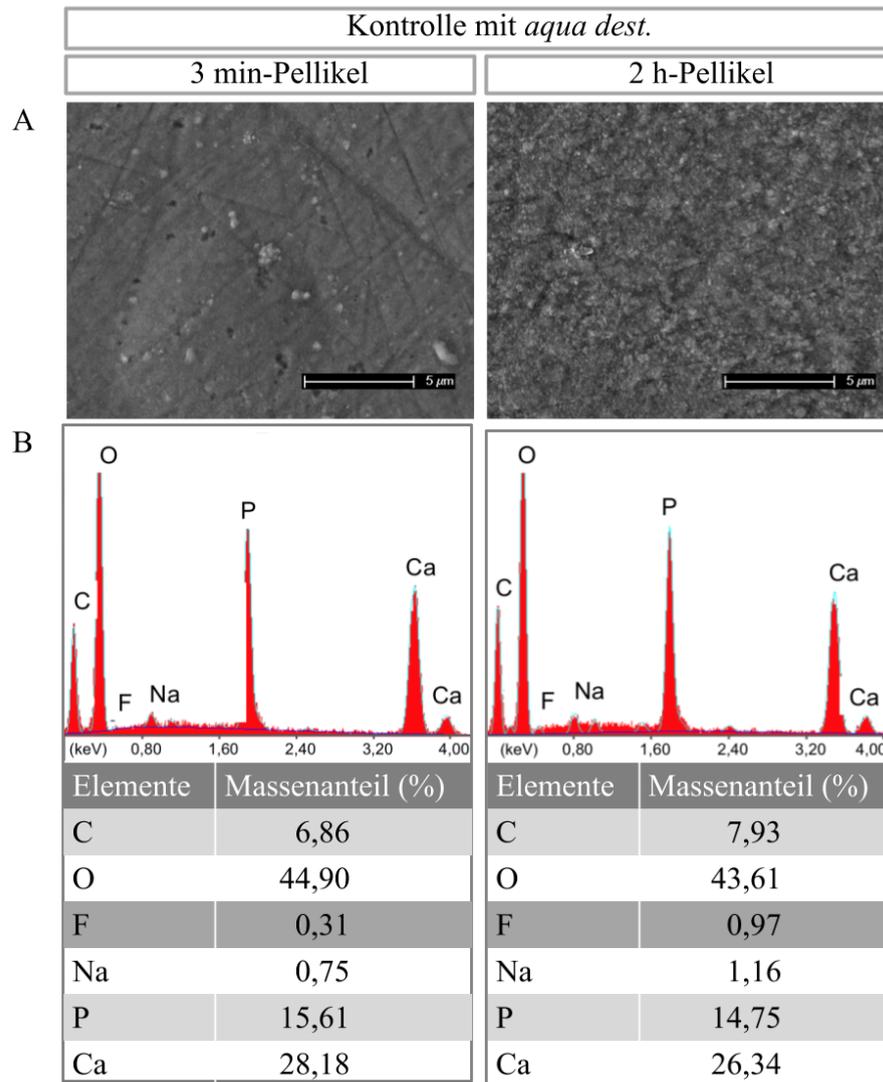


Abb. 4-14: Kontrolle *ex situ* mit *aqua dest.* bei einem pH-Wert von 5,73

Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz wurden für 3 min bzw. 2 h oral exponiert, 5 min *ex situ* in *aqua dest.* inkubiert, anschließend getrocknet und mikroskopiert

A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, 5000-fache Vergrößerung

B) Energiedispersive-Röntgenanalysen und Tabellen der Massenanteile der aufgeführten Elemente

4.3.2 Ergebnisse der Fluoridierung auf Schmelzproben mit 3 min-Pellikel

Nach einer 3-minütigen intraoralen Exposition der Prüfkörper konnten Fluoriddeckschichten nach allen drei Reinigungsprozeduren detektiert werden, wie in Abb. 4-15 dargestellt. Die REM-Analyse zeigte ähnlich homogene Fluoriddeckschichten nach allen drei Reinigungen. Die EDX-Analyse belegte dies. Nach einer 5-sekündigen Reinigung war der bisher höchste Fluoridmassenanteil mit 11,20 % gemessen worden. Auch nach der einstündigen Waschung sowie der dritten Reinigungsmethode, dem wiederholten Auswechseln von *aqua dest.* waren Fluoridmassenanteile detektierbar.

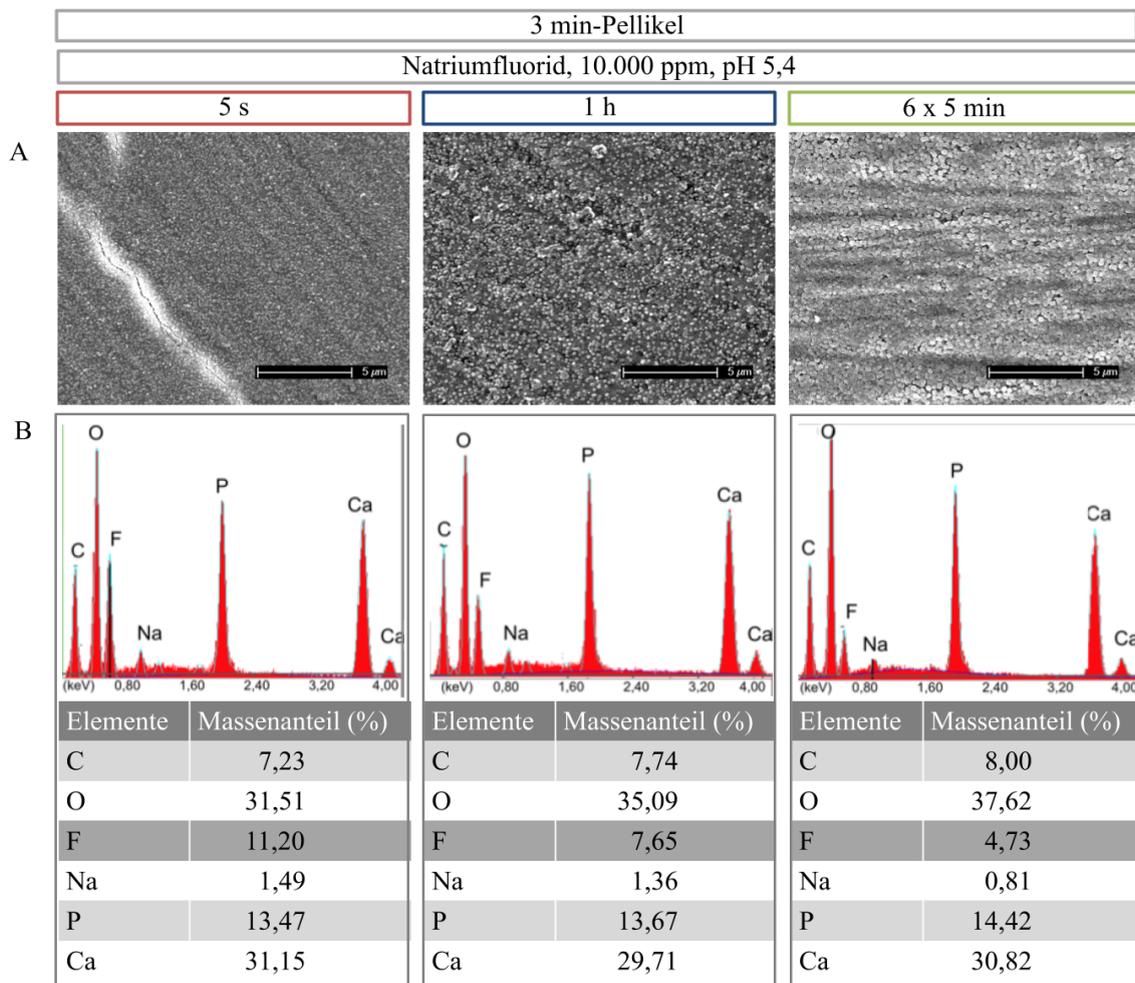


Abb. 4-15: Darstellung der *Ex-situ*-Ergebnisse der Fluoridierung mit NaF bei einem pH-Wert von 5,4 und einer Konzentration von 10.000 ppm

Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz wurden für 3 min oral exponiert, 5 min *ex situ* inkubiert in NaF (10.000 ppm), Reinigung für 5 s, 1 h oder 6 x 5 min in *aqua dest.*, anschließend getrocknet und mikroskopiert

A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, 5000-fache Vergrößerung

B) Energiedispersive-Röntgenanalysen und Tabellen der Massenanteile der aufgeführten Elemente

Die *In-vitro*-Ergebnisse ergaben, dass bei einer Konzentration von 1000 ppm kein Fluorid auf den Prüfkörpern nachgewiesen werden konnte (siehe Seite 34).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der Einfluss der Pellikel die Fluoridierung mit 1000 ppm NaF beeinflussen kann. Abb. 4-16 zeigt, dass auf keinem Prüfkörper Fluorid nachweisbar war, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die 3 min-Pellikel keinen Einfluss auf die Fluoridierung von Zahnschmelz hat.

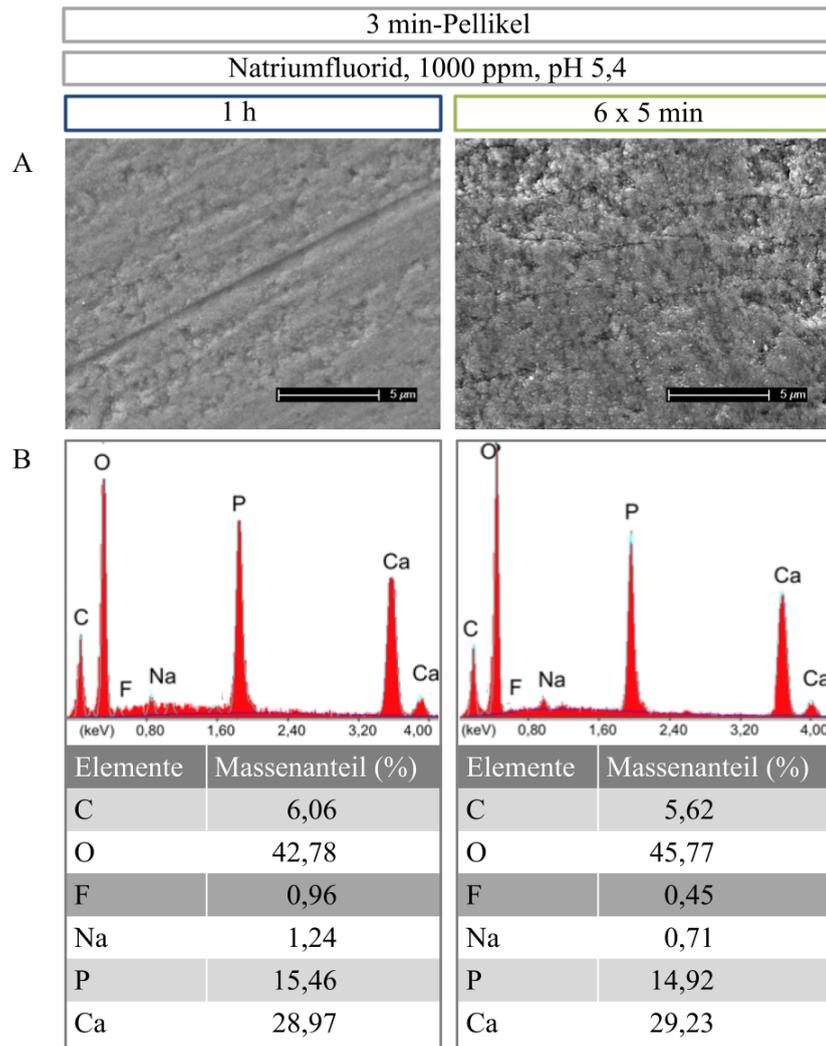


Abb. 4-16: Darstellung der Ergebnisse der Fluoridierung mit NaF bei einem pH-Wert von 5,4 und einer Konzentration von 1000 ppm

Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz wurden für 3 min oral exponiert, 5 min *ex situ* inkubiert in NaF (1000 ppm), Reinigung 5 s, 1 h, 6 x 5 min in *aqua dest.*, anschließend getrocknet und mikroskopiert

A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, 5000-fache Vergrößerung

B) Energiedispersive-Röntgenanalysen und Tabellen der Massenanteile der aufgeführten Elemente

4.3.3 Ergebnisse der Fluoridierung auf Schmelzproben mit 2 h-Pellikel

Nach einer 2-stündigen intraoralen Pellikelbildung konnte nach allen Reinigungsprozeduren Fluorid nachgewiesen werden. In Abb. 4-17 zeigt sich bei allen drei REM-Analysen eine Fluoriddeckschicht. Die Fluoridkonzentration ist im Vergleich zur 3 min-Pellikel gesunken.

Somit lässt sich schlussfolgern, dass es sowohl beim Vorliegen einer 3 min-Pellikel, als auch nach einer 2 h-Pellikel möglich ist mit NaF in Konzentration von 10.000 ppm Fluoriddeckschichten zu generieren, welche auch nach intensiven Waschungen nicht weggespült werden.

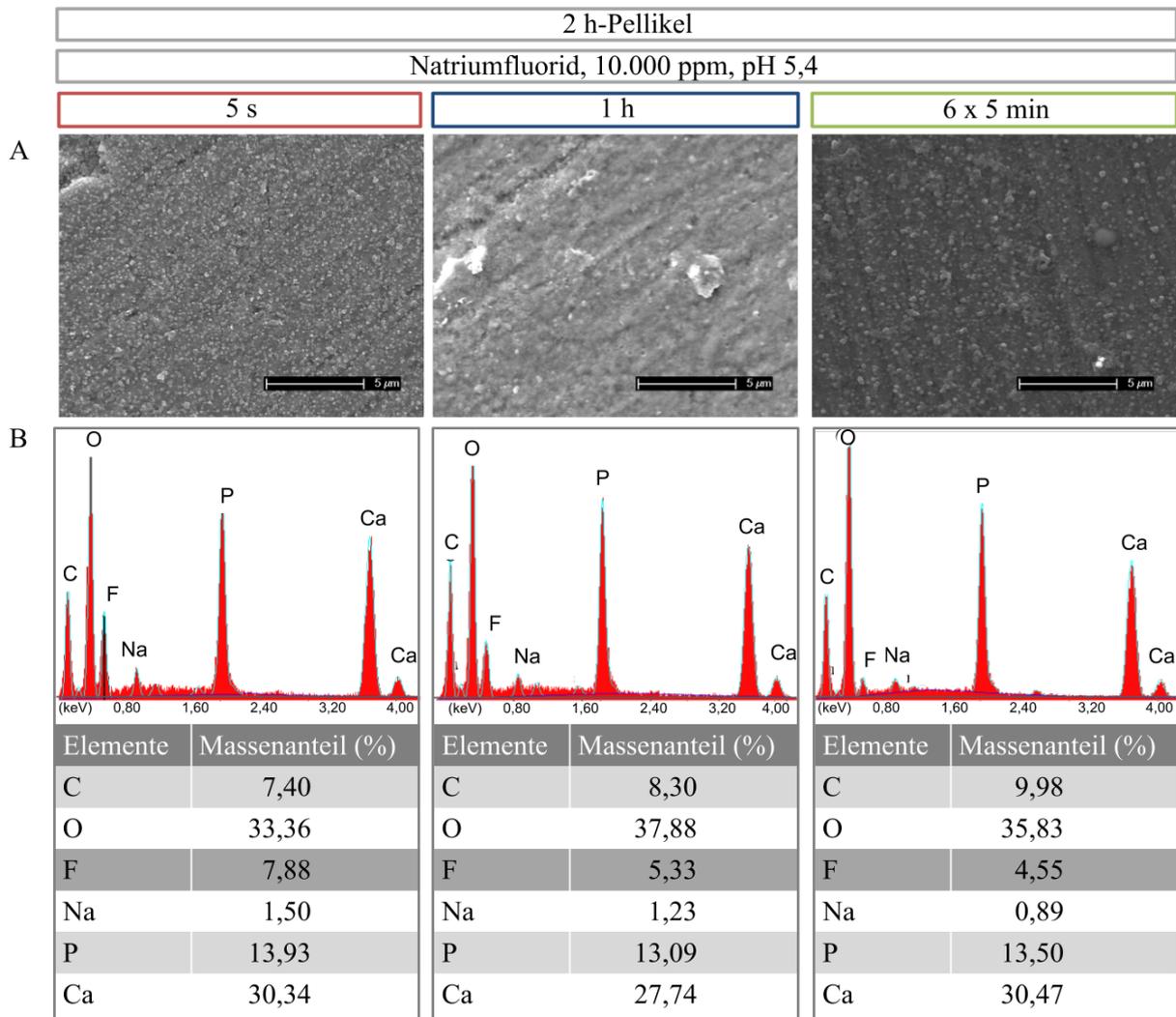


Abb. 4-17: Darstellung der Ergebnisse der Fluoridierung mit NaF bei einem pH-Wert von 5,4 und einer Konzentration von 10.000 ppm

Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz wurden für 2 h oral exponiert, 5 min *ex situ* inkubiert in NaF (10.000 ppm), Reinigung für 5 s, 1 h oder 6 x 5 min in *aqua dest.*, anschließend getrocknet und mikroskopiert

A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, 5000-fache Vergrößerung

B) Energiedispersive-Röntgenanalysen und Tabellen der Massenanteile der aufgeführten Elemente

Abschließend wurde untersucht, ob nach der *Ex-situ*-Applikation von NaF (1000 ppm) auf den Schmelzproben mit 2 h-Pellikel Fluorid nachweisbar ist. Anders als bei der hohen Konzentration von 10.000 ppm konnte nach einer 2 h-Pellikel kein Fluorid nachgewiesen werden, siehe Abb. 4-18. Kongruent zu den Ergebnissen der 3 min-Pellikel sah man auch hier keine Globuli. Desweiteren konnte mittels EDX-Analyse nach einer Stunde Reinigung zwar noch geringfügig Fluorid nachgewiesen werden, bei der intensiven Reinigungsmethode allerdings war der Fluoridmassenanteil unter der Nachweisgrenze. Daraus lässt sich schließen, dass es unter den gewählten Bedingungen, weder *in vitro*, noch *ex situ* möglich ist mit NaF in einer Konzentration von 1000 ppm Fluoriddeckschichten zu bilden und diese zu detektieren.

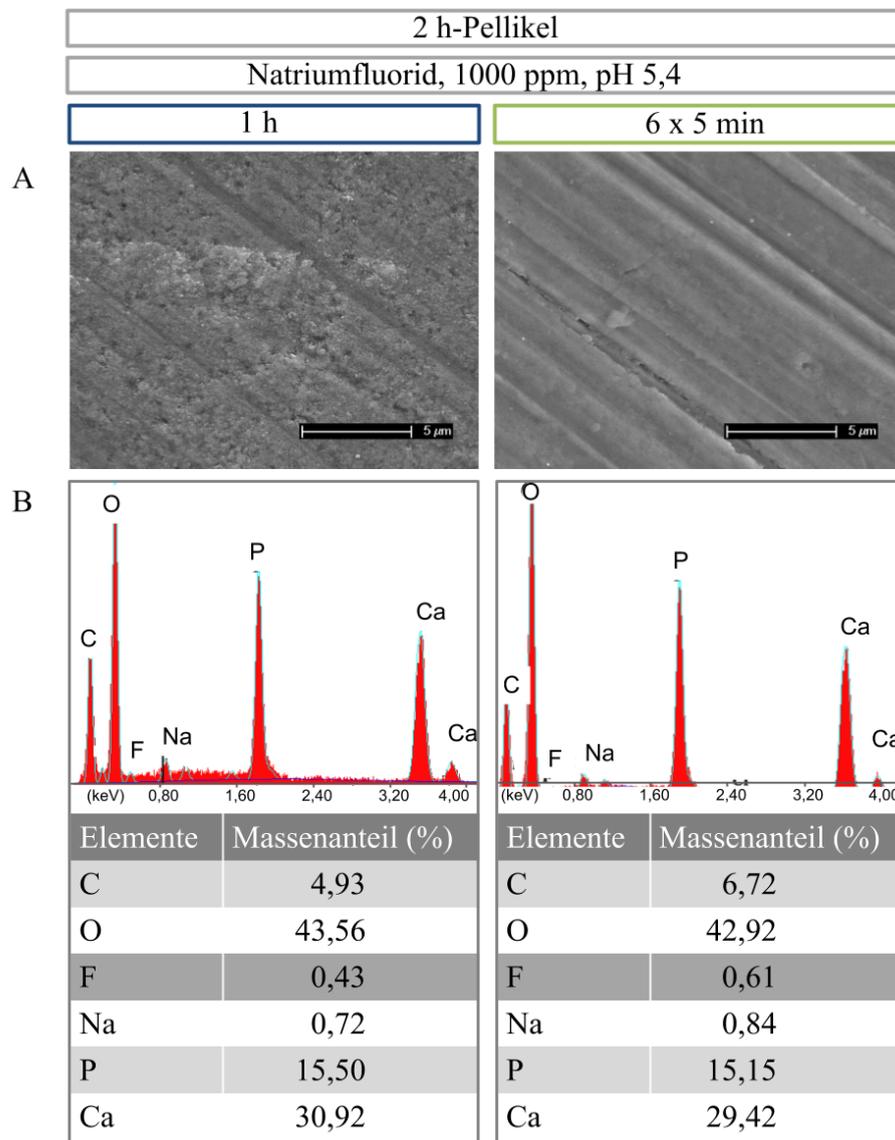


Abb. 4-18: Darstellung der Ergebnisse der Fluoridierung mit NaF bei einem pH-Wert von 5,4 und einer Konzentration von 1.000 ppm

boviner Zahnschmelz, 2 h-Pellikel, 5 min inkubiert in NaF (1000 ppm), Reinigung *ex situ* für 5 s, 1 h oder 6 x 5 min in *aqua dest.*

A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, 5000-fache Vergrößerung

B) Energiedispersive-Röntgenanalysen und Tabellen der Massenanteile der aufgeführten Elemente

Die Übersicht in Abb. 4-19 zeigt Punktmessungen nach Pellikeleinfluss. Es konnte Fluorid nachgewiesen werden. Eine Fluoriddeckschicht zeigte sich nach einer 3 min-Pellikel im Vergleich zu einer 2 h-Pellikel.

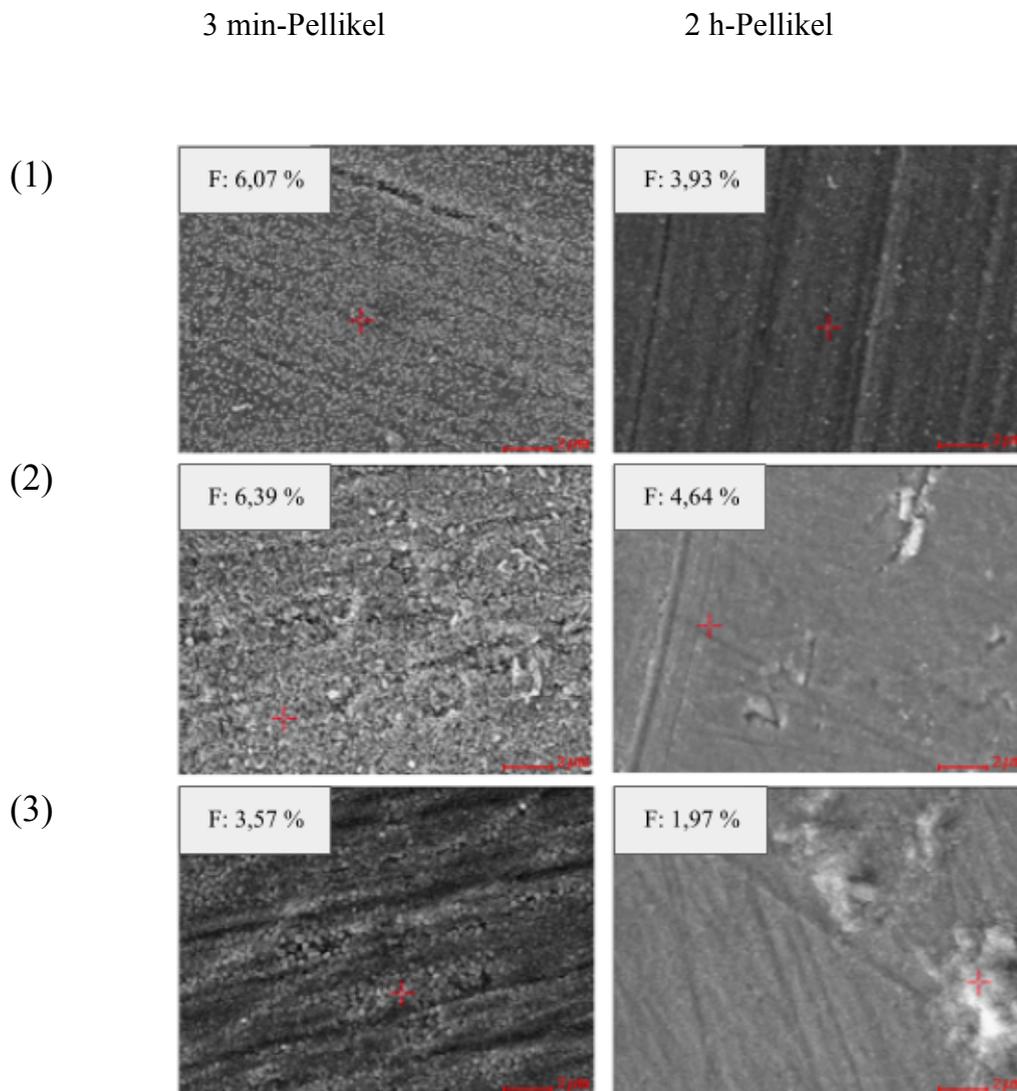


Abb.4-19: Darstellung der Punktmessungen mittels EDX nach Fluoridierung mit NaF
 Prüfkörper aus bovinem Zahnschmelz wurden entweder 3 min (linke Spalte) oder 2 h (rechte Spalte) oral exponiert und danach 5 min in NaF mit einem pH von 5,4 und einer Konzentration von 10.000 ppm inkubiert

Vergrößerung 5000-fach, links oben ist jeweils der Massenanteil an Fluorid der rot gekennzeichneten Punkte A: Punktmessung nach 5 s *aqua dest.* B: Punktmessung nach 1 h *aqua dest.* C: Punktmessung nach 6 x 5 min *aqua dest.*

4.3.4 Übersicht der *Ex-situ*-Ergebnisse

Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse von Schmelzproben, die 3 min oder 2 h oral exponiert und anschließend *in vitro* fluoridiert wurden zeigt in Abb. 4-20, dass es in beiden Fällen gelingen kann, Fluoriddeckschichten mittels hoch konzentriertem NaF zu bilden. Auffallend ist, dass auch hier, wie bereits in den *In-vitro*-Experimenten, die höchsten Fluoridwerte nach 5 s Reinigung erzielt wurden und die geringsten nach der 6 x 5 min Reinigung in *aqua dest.* Die Unterschiede zwischen den beiden intraoralen Expositionszeiten sind nach 5 s und 1 h Reinigung sehr gering. Die Inkubation in niedrig konzentriertem NaF zeigt im Mittel Ergebnisse unter der Nachweisgrenze.

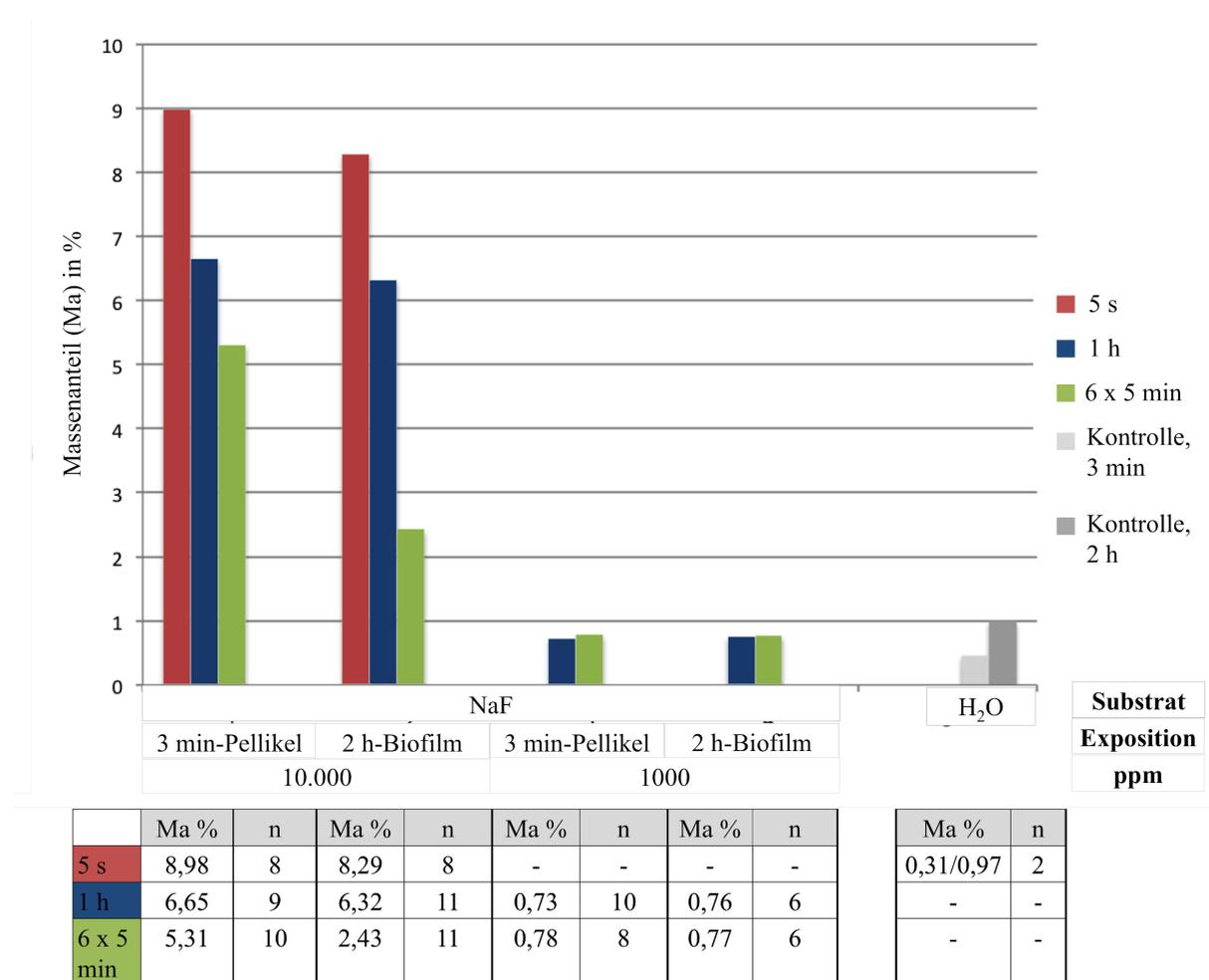


Abb. 4-20: Zusammenfassung der EDX-Analysen aller *Ex-situ*-Versuche

Das Diagramm zeigt auf der y-Achse die Massenanteile (Ma) an Fluorid in % und auf der x-Achse das Substrat NaF mit den Konzentrationen 10.000 und 1000 ppm sowie die Schmelzproben mit 3 min-Pellikel oder 2 h-Pellikel. Ebenfalls die Kontrolle mit *aqua dest.*

Reinigungsmethoden: 5 s / 1 h / 6 x 5 min

Anzahl der Prüfkörper: n

5 Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methodik

5.1.1 Studiendesign und Fragestellung

Um kariöse Läsionen generell zu verhindern oder um Initialkaries einzudämmen, sind der Einsatz von Fluoriden zur lokalen Applikation oder die systemische Trinkwasserfluoridierung die am häufigsten verwendeten Mittel. In zahlreichen Langzeitstudien wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Zahnpasten, Gele und Lacke mit Fluoridzusatz auf ihre Wirkung untersucht (Topping, 2005). Auch die Auswirkungen der Trinkwasserfluoridierung stehen im Mittelpunkt der Kariesforschung (Burk und Eklund, 2005; Slade, 2018). Die Studien zeigen insgesamt, dass Fluoride einen signifikanten Rückgang der DMFS (Decayed Missed Filled Surfaces) zur Folge haben.

Obwohl Fluoride allgegenwärtig sind, steht die Grundlagenforschung über die Ausbildung von Fluoriddeckschichten mit Fluoridlösungen aus Reinstoffen noch am Anfang. In der Literatur lassen sich dazu nur wenige Studien finden. Eine Studie von Petzold aus dem Jahre 2001 beschäftigt sich damit, mit welchen Stoffen und unter welchen Voraussetzungen sich *in vitro* am ehesten CaF_2 -Globulischichten ausbilden lassen (Petzold, 2001).

In dieser Dissertation wurde zusätzlich durch Reinigungsprotokolle mit Wasser die Stabilität der generierten Schichten überprüft und weiterhin *Ex-situ*-Untersuchungen zum Einfluss von der Pellikel durchgeführt.

5.1.2 Auswahl der Fluoride

Die meisten Zahnpasten enthalten NaF und Na_2FPO_3 in einer Konzentration von 1000 - 1450 ppm. Zahnpasten mit einem höheren Fluoridgehalt enthalten zwischen 5000 und 22500 ppm (Walsh et al., 2019). Aus diesem Grund wurden diese zwei Stoffe in den Konzentrationen 10.000 und 1000 ppm für die vorliegende Studie untersucht.

5.1.3 Art, Herstellung und Bearbeitung der Prüfkörper

In der vorliegenden Studie dienten Inzisivi geschlachteter Rinder als Probenmaterial für die Schmelzprüfkörper. Ein Vorteil gegenüber humanen Zähnen ist die schnelle und große Verfügbarkeit an nicht kariös veränderten Zähnen. Der Zahnschmelz dieser Proben ist aufgrund der einheitlichen Ernährung und des annähernd gleichen Schlachalters der Tiere gleichmäßig mineralisiert und fluoridiert. Die hohe Anzahl an verwendeten Prüfkörpern wäre mit humanen Zähnen nur schwer realisierbar gewesen, da für die vorliegende Studie nur Weisheitszähne, aus kieferorthopädischen Gründen extrahierte oder retinierte Zähne in Betracht gekommen wären. Diese weisen wiederum große Unterschiede in ihrer Schmelzzusammensetzung auf. Inzisivi von Rindern sind größer als humane Zähne, wodurch mehrere Prüfkörper aus einem Zahn hergestellt werden können. Die benötigten Dimensionen von 4 x 4 mm wären mit humanen Zähnen nur schwer realisierbar gewesen.

Bei einem Vergleich von humanen und bovinen Zähnen hinsichtlich der Mikrostruktur sowie der chemischen Zusammensetzung gibt es keine nennenswerten Unterschiede, sodass die Ergebnisse auf humane Zähne übertragen werden können (Nakamichi et al., 1983; Esser et al., 1998).

Jedoch muss beachtet werden, dass Rinderzähne eine erhöhte Erosionsempfindlichkeit haben. Bei einem Versuch von Featherstone und Mellberg (1981) wurde festgestellt, dass boviner Zahnschmelz dreimal empfindlicher gegenüber Milchsäure reagiert als humaner Schmelz (Featherstone und Mellberg, 1981).

Alle Prüfkörper wurden mit einem Schleifgerät bis zu einer Korngröße von 2500 poliert, um eine einheitliche Oberflächenbeschaffenheit zu erzeugen.

Eine Studie hat gezeigt, dass die Entstehung von Biofilmen zunächst an Oberflächenunebenheiten beginnt (Quirynen und Bollen, 1995). Aus diesem Grund wurde darauf geachtet, dass die Schmelzprüfkörper keine tiefen Schliffacetten aufweisen.

5.1.4 Probandenselektion

An der Studie nahmen vier Probanden teil. Die Anzahl der Probanden orientierte sich an frühere Studien mit ähnlichem Aufbau (Keßler, 2010; Bauer, 2011) . Es wurden für die *Ex-situ*-Versuche insgesamt 89 Proben rasterelektronenmikroskopisch und mittels EDX analysiert.

Die allgemeine und spezielle Anamnese der Probanden zeigte keine systemischen Erkrankungen, welche die Pellikelbildung beeinträchtigen könnte. Einschränkungen würde es bei Hyposalivation geben, die durch vielerlei Ursachen zustande kommt. Die häufigste Ursachen sind ein Flüssigkeitsmangel sowie medikamentenassoziierte Mundtrockenheit (Sreenbny und Schwartz 1997; Bertaud-Gounot et al., 2013, Oronsky et al., 2018).

Die Speichelzusammensetzung ist auch von verschiedenen Faktoren wie Ernährungsgewohnheiten (Linkosalo et al., 1985) abhängig. Der Gehalt an Immunglobulin A (sIgA) im Speichel hängt vom zirkadianen Rhythmus ab (Plangsangmas et al., 2020). Aus diesem Grund durften die Probanden während der Exposition nichts anderes außer Wasser trinken und keine Nahrung zu sich nehmen. Das Tragen der Schienen erfolgte zwischen 9 und 11 Uhr morgens.

5.1.5 Pellikelbildung

Die Erzeugung von Pellikel ist generell *in vitro*, *in vivo*, *in situ* oder *ex situ* möglich. In dieser Studie wurde die Pellikel *in situ* produziert. *In-vitro*-Pellikel, also künstlich erzeugte Pellikel, haben den Nachteil, dass die reale Situation nicht eindeutig wiedergegeben werden kann. *In-vitro*-Pellikel bieten allerdings den Vorteil, dass kritische Substanzen auf ihre Biokompatibilität auf den menschlichen Körper getestet werden können.

Die Pellikelbildung wurde auf nicht fluoridierten Prüfkörpern vorgenommen. Es bestand die Gefahr, dass beim Herstellen der sauren NaF-Lösung die hochschädliche Fluorwasserstoffsäure entstehen könnte. Fluorwasserstoffsäure hat eine stark ätzende Wirkung auf Haut und Schleimhäute. Systemisch beeinträchtigt sie den Kalziumstoffwechsel und verursacht starke Schmerzen und Zellschädigungen (Litovitz et al., 1997).

Um die Adhäsion und die Interaktion der Fluoride an Pellikel zu testen sind *Ex-situ*-Versuche sinnvoll. Nach Ausschluss von möglichen Nebenwirkungen der zu testenden Substanzen können *In-vivo*- bzw. *In-situ*-Versuche vorgenommen werden. Dabei bedeutet *in vivo*, dass getestet wird, inwiefern die Pellikel, welche sich auf Zähnen bildet mit verschiedenen Fluoridpräparaten interagiert. *In situ* heißt, dass eben diese Fluoridpräparate im Rahmen der intraoralen Exposition mit Pellikel interagieren, die in der Mundhöhle auf Prüfkörpern gebildet wurden (Hannig und Hannig, 2009).

In dieser Studie wurden die Prüfkörper auf Schienen befestigt und von Probanden für 3 min oder 2 h getragen. Der Vorteil dieser Methode ist die einfache und schnelle Handhabung. Die Schienen können zur Nahrungsaufnahme entnommen werden, wobei dies bei der kurzen Exposition nicht nötig war. Die Schiene umfasste nicht den Gaumen, um die palatinalen Speicheldrüsen nicht zu bedecken.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Einfluss der Konzentration

Um reproduzierbare Fluoriddeckschichten zu bilden, wurde die Konzentration von NaF variiert. Aus den vorliegenden Versuchen lässt sich der Schluss ziehen, dass die Ausbildung von Fluoriddeckschichten mit NaF nur bei einer hohen Konzentration von 10.000 ppm möglich ist. Eine Konzentration von 1000 ppm reicht nicht aus. In zukünftigen Studien sollte untersucht werden wie weit die Konzentration gesenkt werden kann, um Fluoriddeckschichten ausbilden zu können. Nach einer Inkubation in Na_2FPO_3 mit einer Konzentration von 10.000 ppm konnten keine stabilen Fluoriddeckschichten gebildet werden.

Petzold (2001) versuchte ebenfalls mit kommerziellen Stoffen aus NaF und Na_2FPO_3 Fluoriddeckschichten auf humanem Zahnschmelz zu bilden. Dabei konnten erste Globuli mit 0,1%igem NaF (1000 ppm) bei einem pH-Wert von 4,5 bereits nach 20 Sekunden gebildet werden. Demnach konnte Petzold unter seinen Versuchsbedingungen auch mit niedrig dosierten Fluoriden Fluoriddeckschichten erzeugen (Petzold, 2001). Dies gelang innerhalb dieser Dissertation aber nicht. Demnach wäre es überlegenswert für künftige Studien den NaF (1000 ppm) ohne Reinigung mit *aqua dest.* zu untersuchen.

In Untersuchungen von Duraphat (NaF-Lack) mit einer Konzentration von 2,3 % (23000 ppm) sowie einem NaF-Lack mit einer Konzentration von 1,1 % (11.000 ppm) wurde festgestellt, dass es hinsichtlich der Entwicklung kariöser Stellen über einem Zeitraum von einem Jahr keine signifikanten Unterschiede gab. Demnach wäre es überlegenswert den Fluoridgehalt in NaF-Lacken generell zu senken (Seppä et al., 1994). Eine Betrachtung von Fluoridlösungen mit noch höheren Konzentrationen als 10.000 ppm ist nicht zwingend notwendig.

Da handelsübliche Zahnpasten meistens einen Fluoridgehalt von 1500 ppm enthalten, kann anhand der vorliegenden Studie ihre Effektivität hinsichtlich der Erzeugung von Fluoriddeckschichten kritisch hinterfragt werden. Das Review von Walsh et al. (2010) beleuchtet aber, dass Zahnpasten mit einem Fluoridgehalt über 1000 ppm signifikant dazu beitragen Karies zu reduzieren (Walsh et al., 2010). In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass Kontrollgruppen, die sich die Zähne mit nicht-fluoridhaltigen Substanzen geputzt haben, öfter kariöse Läsionen hatten. Dagegen waren Gruppen, die fluoridhaltige

Substanzen verwendeten, signifikant weniger von Karies betroffen (Griffin et al., 2007; Medjedovic, 2015).

Dies kann man unter anderem auf den mechanischen Effekt des Bürstens zurückführen sowie auf die Putzkörper, welche die Bakterien entfernen. Der genaue Mechanismus der Fluoridierung ist bisher noch immer nicht vollständig erforscht worden (Walsh et al., 2010, Rugg-Gunn und Bánóczy, 2013).

In zukünftigen Untersuchungen wäre es sinnvoll wiederholt und über einen längeren Zeitraum die NaF-Lösung auf denselben Prüfkörper aufzutragen, um das tägliche Zähneputzen besser zu simulieren.

5.2.2 Einfluss des pH-Wertes

Da mit der NaF-Lösung mit ihrem ursprünglichen pH-Wert von 9,8 keine reproduzierbaren Fluoriddeckschichten ausgebildet werden konnten, wurde der pH-Wert mit Salzsäure gesenkt. Reproduzierbare Fluoriddeckschichten nach Inkubation in NaF konnten nur bei einem sauren pH-Wert von 5,4 gebildet werden, der geringfügig unter dem kritischen Wert von 5,5 liegt. Sie wurden in Form von CaF_2 -Globuli auf der Oberfläche des Prüfkörpers ausgebildet. Die NaF-Lösung mit einem pH-Wert von 6,3 zeigte keine signifikanten Vorteile gegenüber der Lösung mit dem pH-Wert 9,8. Es lässt sich daraus schließen, dass eine Abhängigkeit gegenüber dem pH-Wert und der Bildung von Fluoriddeckschichten besteht.

Vergleichbare Ergebnisse über diesen Zusammenhang finden sich auch in der Literatur. In einer klinischen Studie wurden NaF-Lösungen auf orthodontisch behandelten Zähnen appliziert. Es wurde festgestellt, dass eine NaF-Lösung mit einem pH-Wert von 7,0 auf dem Zahnschmelz niedrigere Fluoridkonzentrationen hinterlässt, als eine NaF-Lösung mit einem pH-Wert von 1,2 (Øgaard, 1988a).

Auch eine *In-vitro*-Studie zeigte, dass eine 2%ig (20.000 ppm) konzentrierte NaF-Lösung mit einem pH-Wert von 3,5 einen besseren Remineralisationseffekt gegenüber einer Lösung mit einem pH-Wert von 7,0 hat (Gonzales-Cabezas et al., 2012).

In Anbetracht der Ergebnisse der vorliegenden Studie sowie denen aus der Literatur kann im Konsens gesagt werden, dass Fluoridpräparate im sauren pH-Bereich einen signifikanten Vorteil gegenüber Fluoriden im neutralen oder basischen Bereich haben.

Eine Feinjustierung des pH-Wertes um reproduzierbare Fluoriddeckschichten zu bilden und dennoch einen möglichst geringen Angriff des Zahnschmelzes zu gewährleisten, wäre in zukünftigen Studien eine sinnvolle Zielsetzung.

5.2.3 Stabilität der generierten Schichten

Die in dieser Arbeit durchgeführte 5-minütige-Inkubation der Schmelzprüfkörper in den Fluoridlösungen sollte die durchschnittliche Dauer des Zähneputzens simulieren. In zukünftigen Untersuchungen sollten zusätzlich auch längere und wiederholende Inkubationszeiten in den Fluoridpräparaten betrachtet werden.

In klinischen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass aufgetragene Lacke mit NaF-Zusatz die Remineralisierung fördern und frühe Karies verhindern. Diese werden meistens durch zahnmedizinisches Fachpersonal aufgetragen und können noch nach mehreren Stunden auf dem Zahnschmelz nachgewiesen werden (Gao et al., 2016).

Kürzere Expositionszeiten zur Bildung von Fluoriddeckschichten untersuchte Petzold unter anderem mit NaF und Na_2FPO_3 . Erste Globuli konnten mit 0,1%igem NaF (1000 ppm) bereits nach 20 Sekunden Inkubation gebildet werden. Nach zwei Minuten war die Oberfläche kontinuierlich mit Globuli beschichtet. Mit Na_2FPO_3 wurden allerdings, wie in der vorliegenden Studie, keine Fluoriddeckschichten ausgebildet (Petzold, 2001).

In einer Studie von Faidt et al. (2017) wurde synthetisch erzeugtes Hydroxylapatit bis zu 300 s in NaF (500 ppm und pH-Wert 5,5) inkubiert. Es wurde analysiert ab welchem Zeitpunkt Fluoridionen nicht mehr durch Hydroxidionen ausgetauscht werden. Weiterhin wurde ein Zusammenhang zur Eindringtiefe hergestellt. Nach 60% der Applikationszeit konnte kein Fluorid mehr in die Prüfkörper aufgenommen werden. Fluorid drang nicht mehr tiefer in die Hydroxylapatitstruktur ein (Faidt et al., 2017).

Die durchgeführten Waschungen der Prüfkörper mit Wasser dienten zum einen einer Simulation des einmaligen Spülens im Falle der 5-sekündigen Waschung oder intensiveren

Spülen in den beiden anderen Waschungen (1 h oder 6 x 5 min *aqua dest.*, siehe Kapitel 3.5.1). Die Tatsache, dass das kurze Spülen mit Wasser die höchsten Fluoridkonzentrationen zur Folge hatte, bestätigt die früheren Empfehlungen mit möglichst wenig Wasser nach dem Zähneputzen auszuspülen und damit den Fluoridierungseffekt zu verbessern (Chesters et al., 1992; Sjøgren und Birkhed, 1993; Twetman, 2009).

Durch das Verfahren des Blockface-Imaging konnte nachgewiesen werden, dass nach Inkubation in hoch dosiertem NaF mit einem pH-Wert von 5,4 tatsächlich CaF_2 -Globulischichten gebildet wurden. Bereits sehr alte Literatur bestätigt den in der vorliegenden Studie beobachteten Zusammenhang, dass hoch dosierte fluoridhaltige Lösungen im sauren pH-Bereich zur Ausbildung dieser Schichten führen (Rae und Clegg, 1945; McCann, 1952).

Da in der Literatur beschrieben wird, dass niedrig dosierte und neutrale Fluoridlösungen eher zur Ausbildung von Fluorapatit führen, sollten in künftigen Versuchsreihen auch Prüfkörper, die in NaF mit einem pH-Wert von 6,3 bzw. 9,8 inkubiert wurden sowie niedrig dosierte NaF-Lösungen mit Hilfe des Blockface-Imaging untersucht werden (Aasenden et al., 1968; Grøn, 1977; Saxegaard und Rølla, 1989).

5.2.4 Einfluss der Pellikel

Eine Betrachtung des Einflusses von der Pellikel auf die Fluoridierung ist für die klinische Relevanz der *In-vitro*-Untersuchungen sinnvoll. Untersucht wurden zum einen Schmelzproben mit einer 3 min-Pellikel, da in der Mundhöhle niemals der Zustand ohne Pellikel besteht. Zum anderen wurden Schmelzproben mit einer 2 h-Pellikel analysiert, um den Zustand der Schmelzoberfläche in der Mundhöhle während eines Tagesverlaufes zu simulieren.

Die REM-Bilder zeigten insbesondere auf den Schmelzproben mit einer 3 min-Pellikel homogene globuläre Strukturen der Fluoriddeckschicht. Nach einer 2 stündigen intraoralen Exposition der Schmelzproben war ebenfalls eine Fluoriddeckschicht mit globulären Elementen visualisierbar, allerdings waren diese nach 1 h oder 6 x 5 min *aqua dest.* nicht mehr homogen verteilt.

Die Fluoridkonzentration auf dem Schmelz zeigte nach der Inkubation der pellicelbedeckten Proben im hoch dosiertem NaF (10.000 ppm) nach einer 5 s und 1 h Reinigung in *aqua dest.* kaum Unterschiede (siehe Kapitel 4.3.4). Nach der 6 x 5 min Reinigung war die Fluoridkonzentration im Schmelz mehr als doppelt so hoch bei den Proben mit 3 min-Pellicel im Vergleich zu den Proben mit 2 h-Pellicel. Daraus resultiert, dass eine Applikation von Fluoridpräparaten auf geputzten Zähne erfolgen sollte. Eine Fluoridapplikation nach einem längeren Zeitraum der oralen Pellicelbildung über z.B. 12 h sollte in zukünftigen Untersuchungen betrachtet werden. Dies stellt eine Zeitspanne zwischen zwei Zahnputzvorgängen im Alltag dar.

NaF mit einer Konzentration von 1000 ppm führte auch nach Pellicelexposition zu keiner Erzeugung von Fluoriddeckschichten. Eine Feinjustierung der Fluoridkonzentration wäre in künftigen *Ex-situ*-Untersuchungen an Schmelzproben, auf denen *In-situ*-Pellicel gebildet wurde, sinnvoll.

In der Studie von Scholz et al. (2019) wurden humane Schmelzprüfkörper mit unterschiedlichen fluoridhaltigen Gelen beschichtet. Proben wurden mit NaF (12500 ppm und pH-Wert von 7,0 und 4,75) für 60 s inkubiert. Die Hälfte der Prüfkörper wurde zuvor 2 h in Speichel eingelegt. Mittels EDX konnte analysiert werden, inwiefern die Pellicel die Fluoridierung beeinflusst. Es wurde gemessen wie hoch die Fluoridkonzentration auf den jeweiligen Prüfkörpern ist. Nach der Beschichtung mit neutralem Gel zeigten sich nur geringe Fluoridmassenanteile sowohl mit als auch ohne Pellicel. Eine Beschichtung mit NaF-Gel mit einem pH-Wert von 4,75 zeigte geringfügig höhere Fluoridkonzentrationen ohne Pellicel als mit Pellicel (Scholz et al., 2019). In dieser Studie gab es nur einen geringen Unterschied der Fluoridergebnisse ohne Pellicel (F= 8,02%) und nach einer 2 h-Pellicel (F=8,29%).

Reine Fluoridstoffe und ihren Einfluss auf *In-situ*-Pellicel untersuchten Kensche et al., (2019). Es konnte beobachtet werden, dass Fluoride die Ausbildung der Pellicel kaum beeinflusst haben (Kensche et al., 2019).

In dieser Studie gab es nach allen drei Reinigungsmethoden geringfügige Erhöhung der Fluoridwerte nach Ausbildung einer 3 min-Pellicel im Vergleich zu den Ergebnissen ohne Pellicel (siehe Abb. 4-12 und 4-20). Nach einer *in situ* gebildeten 2 h-Pellicel konnte nach den Reinigungsmethoden 5 s und 1 h *aqua dest.* auch eine geringfügige Erhöhung der Fluoridwerte beobachtet werden. Weitere Untersuchungen des Einflusses der Pellicel auf

Ausbildung von Fluoriddeckschichten sollten in jedem Fall Gegenstand zukünftiger Studien werden, da sich bisher nur wenige Autoren damit beschäftigt haben.

Eine Reduzierung des Biofilms ließ sich in Untersuchungen mit einem niedrig dosierten NaF (0,243 %) nicht nachweisen (Fernández et al., 2016). Eine Betrachtung, inwiefern dies mit unterschiedlich konzentrierten Reinstoffen möglich ist, sollte ebenfalls in zukünftigen Studien erfolgen.

5.2.5 Eindringtiefe des Fluorids

Das Blockface-Imaging gab Aufschluss darüber, ob sich Fluorid in den Zahnschmelz einlagern kann. Die Untersuchungen wurden nur mit NaF bei einer Konzentration von 10.000 ppm und einem pH-Wert von 5,4 vorgenommen, da zuvor für diese Versuchsreihe *in vitro* die höchsten Massenanteile an Fluorid gemessen werden konnten.

In den REM-Aufnahmen des Blockface-Imaging ist deutlich zu sehen, dass eine Einlagerung in den bovinen Schmelz nicht nachweisbar war. Nach nur wenigen μm ist unterhalb der Schmelzoberfläche kein Fluorid mehr detektierbar. Demnach konnte zwar eine oberflächliche Auflagerung von Fluorid in Form von CaF_2 -Globuli erzielt werden, eine Einlagerung in den Zahnschmelz fand aber nicht statt. Für weitere Untersuchungen sollte überprüft werden, inwiefern die 5-sekündige Reinigung den Effekt der Einlagerung beeinflusst, indem keine Reinigungen durchgeführt werden. Es sollte ausgeschlossen werden, ob ein mechanischer Effekt des Spülens dazu beiträgt, dass Fluorid nicht eingelagert werden kann. Die Untersuchung der Prüfkörper der *Ex-situ*-Versuchsreihe mit Hilfe des Blockface-Imaging wäre für zukünftige Versuche ebenfalls sinnvoll.

In der Literatur existieren zur Einlagerung von Fluorid in den Schmelz unterschiedliche Ergebnisse. Dijkman et al. untersuchten APF (NaF und H_3PO_4) mit einem pH-Wert von 4,0 in Konzentrationen zwischen 0,11 % (etwa 1000 ppm) und 1,23 % (über 10.000 ppm). In dieser Studie konnte sich Fluorid bis zu 10 μm tief in den Schmelz einlagern, wobei sich die Fluoridkonzentration in den tiefen Schichten im Vergleich zur oberen Schicht auf etwa ein Drittel reduziert hat. Es gab keinen signifikanten Vorteil von hochprozentigen Fluoridkonzentrationen gegenüber den niedriger konzentrierten (Dijkman et al., 1982).

Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Holler et al. (2002). NaF mit einer Konzentration von 1600 ppm wurde für diese Versuche verwendet. Nach einer Applikationszeit von 5 min konnte in der 20 µm dicken Schicht eine Verdreifachung der Fluoridkonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. In der darunter liegenden 20 µm Schicht konnte kaum noch Fluorid detektiert werden. Nach einer Inkubationszeit von 24 h mit NaF wurde in der oberflächlichen Schicht ein 15-fach erhöhter Fluoridanteil nachgewiesen. Je tiefere Schmelzschichten gemessen wurden, desto geringer war die Konzentration an Fluorid. Diese Ergebnisse zeigten sich auch für die anderen drei untersuchten Fluoride: Olaflur, Oleaflur und ein experimentelles Fluorid mit hydrolysiertem Casein mit Fluoridzusatz. Die pH-Werte aller hier getesteten Fluoridlösungen lagen ausschließlich im sauren pH-Bereich (Holler et al., 2002).

Müller et al. (2010) untersuchten ebenfalls die Eindringtiefe von NaF (246 ppm und pH-Wert 6,2) in synthetische Schmelzproben. Sie haben bestätigt, dass neutrale Fluoridlösungen zu keiner Veränderung der Schmelzstruktur führen und eine geringe Eindringtiefe von Fluorid (6 nm) zur Folge haben. Der Fluoridierungseffekt kommt durch das Austauschen von Hydroxid- durch Fluoridionen und durch Bildung von Fluorapatit zustande (Müller et al., 2010).

5.2.6 Vergleich zwischen NaF und Na₂FPO₃

Die Inkubation in NaF mit einem pH-Wert von 5,4 lieferte höhere Fluoridkonzentrationen im Vergleich zu Na₂FPO₃. Inkubation in NaF mit den pH-Werten 9,8 und 6,3 hatten gegenüber Na₂FPO₃ keine höheren Fluoridwerte im Durchschnitt.

Auf den REM-Bildern der Schmelzproben nach Applikation des hoch dosierten NaF mit einem pH-Wert von 5,4 sieht man nach allen drei Reinigungsmethoden homogene, globuläre Fluoriddeckschichten. Obwohl die Fluoridkonzentrationen von NaF bei einem pH-Wert von 6,3 gering waren, konnten nach den Reinigungsmethoden 5 s und 1 h *aqua dest.* trotzdem vereinzelte Globuli auf dem Zahnschmelz gefunden werden. Bei einem pH-Wert von 9,8 waren nach einer Reinigung von 5 s ebenfalls Globuli zu detektieren. In den einzelnen Punktmessungen konnte aber festgestellt werden, dass die globulären Strukturen nur wenig

Fluorid enthielten, sodass es für zukünftige Untersuchungen sinnvoll wäre, Bruchpräparate für diese Prüfkörper anzufertigen und diese zu analysieren.

In einer Metaanalyse, bei der sowohl *In-vitro*-Untersuchungen als auch klinische Studien in Betracht gezogen wurden, konnte nachgewiesen werden, dass NaF signifikant höhere Fluoridkonzentrationen nach Aufbringen eines Fluoridpräparates auf Prüfkörper erzeugt als Na_2FPO_3 . Weiterhin konnten mittels NaF bessere Remineralisierungseffekte erzielt werden und die Entstehung der Karies inhibiert werden (Stookey et al., 1993).

Eine andere Untersuchung zeigte aber wiederum, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Stoffen bezüglich der protektiven Wirkung gegen Karies gibt (Volpe et al., 1995).

In aktuellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass auch Na_2FPO_3 einen remineralisierenden Effekt auf Schmelz ausübt (Damle et al., 2010). Durch Modifikation dieser Substanz wurde in anderen Untersuchungen versucht die kariesprotektive Wirkung zu steigern (Gaffar et al., 1993; Sullivan et al., 2013; Parkinson et al., 2017).

Demnach wäre eine Variation des pH-Wertes, der Konzentration sowie die Betrachtung des Einflusses von Pellikel auch für Na_2FPO_3 sinnvoll.

6 Schlussfolgerung

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie wurde nachgewiesen, dass es grundsätzlich möglich ist unter den gewählten Bedingungen mittels einer Lösung aus reinem NaF bei einer Konzentration von 10.000 ppm und einem pH-Wert von 5,4 reproduzierbare und stabile Fluoriddeckschichten zu bilden. Bei einer Konzentration von 1000 ppm bildeten sich keine Fluoriddeckschichten aus. NaF-Lösungen mit einer Konzentration von 10.000 ppm und den pH-Werten 6,3 und 9,8 konnten Fluoriddeckschichten ausbilden, die allerdings nur partiell einer kurzzeitigen Reinigung mit Wasser standhielten. Mit einer Lösung aus reinem Na₂FPO₃ war es für den Fall einer kurzen Reinigung von 5 s mit Wasser möglich Fluoriddeckschichten zu bilden. Folglich haben Fluoride im sauren pH-Bereich gegenüber Fluoriden in neutralen pH-Bereich einen Vorteil bei der Ausbildung von Fluoriddeckschichten. In zukünftigen Studien sollte eine Feinjustierung des pH-Wertes sowie der Konzentration erfolgen.

NaF mit einem sauren pH-Wert von 5,4 ist in der Lage die stabilsten Fluoriddeckschichten zu bilden, die gegen intensive Waschungen beständig auf der Oberfläche der Prüfkörper verbleiben. Auf Grundlage des Blockface-Imaging wurde nachgewiesen, dass es sich bei den Fluoriddeckschichten um CaF₂-Globuli handelt. Weiterhin zeigte sich durch das Blockface-Imaging, dass es nicht möglich war NaF unter den gewählten Bedingungen in den Schmelz einzulagern. Eine Untersuchung von handelsüblichen Zahnpasten in Bezug auf die Einlagerung könnte in zukünftigen Studien durchgeführt werden, um festzustellen, ob eine Einlagerung von Fluorverbindungen in tiefe Schichten überhaupt von großem Nutzen bei der Kariesprophylaxe ist.

Im Rahmen der Versuche zeigte sich ein nur geringer Unterschied der Fluoridkonzentration der Schmelzproben nach einer intraoralen Exposition von 3 min und 2 h vor der anschließenden *in vitro* Inkubation in NaF. Sowohl auf den Proben mit 3 min-Pellikel als auch der Proben mit 2 h-Pellikel sind rasterelektronenmikroskopisch Fluoriddeckschichten zu erkennen. Es gab kaum Unterschiede der Fluoridkonzentration gegenüber den *In-vitro*-Versuchen mit NaF ohne Pellikelbildung. In zukünftigen Studien sollten *In-situ*-Versuche durchgeführt werden, bei denen Probanden NaF-Lösungen intraoral anwenden.

7 Literaturverzeichnis

1. Aasenden R, Brudevold F, McCann HG (1968) The response of intact and experimentally altered human enamel to topical fluoride. *Archives of Oral Biology*, 13:543-552
2. Arends J, Christoffersen J (1986) The Nature of Early Caries Lesions in Enamel. *Journal of Dental Research* 65:2-11
3. Arnold FA (1942) The production of carious lesions in the molar teeth of hamsters (*C. auratus*). *Public Health Reports* 57:1599-1604
4. Bauer C (2011) Ultrastrukturelle Analyse von Bioadhäsions-und Erosionsprozessen am Dentin.
5. Berg IC, Rutland MW, Arnebrant T (2003) Lubricating properties of the initial salivary pellicle – an AFM study. *Biofouling* 19:365-369
6. Bertaud-Gounot V, Kovess-Masfety V, Perrus C, Trohel G, Richard F (2013) Oral health status and treatment needs among psychiatric inpatients in Rennes, France: a cross-sectional study. *BMC psychiatry* 13:227
7. Bruun C, Stoltze K (1976) In vivo uptake of fluoride by surface enamel of cleaned and plaque-covered teeth. *Scandinavian Journal of Dental Research* 84:268-275
8. Buchalla W, Attin T, Schulte-Möning J, Hellwig E (2002) Fluoride uptake, retention, and remineralization efficacy of highly concentrated fluoride solution on enamel lesions in situ. *Journal of Dental Research* 81:329-333
9. Burt BA, Eklund SA (2005) Dentistry, dental practice, and the community. Elsevier Health Sciences, St. Louis
10. Caslavaska V, Gron P, Kent RL, Joshipura K, De Paola PF (1991) CaF₂ in Enamel Biopsies 6 Weeks and 18 Months after Fluoride Treatment. *Caries Research* 25:21-26
11. Chesters RK, Huntington E, Burchell CK, Stephen KW (1992) Effect of oral care habits on caries in adolescents. *Caries Research* 26:299-304
12. Christoffersen J, Christoffersen MR, Kibalczyk W, Perdok WG (1988) Kinetics of dissolution and growth of calcium fluoride and effects of phosphate. *Acta Odontologica Scandinavica* 46:325-336

13. Cury JA, Ricomini-Filho AP, Berti FLP, Tabchoury CP (2019) Systemic Effects (Risks) of Water Fluoridation. *Brazilian Dental Journal* 30:421-428
14. Damle SG, Bengude V, Saini S (2010) Evaluation of ability of dentifrices to remineralize artificial caries-like lesions. *Journal of Dental Research (Isfahan)* 7:12-17
15. Dawes C (2003) What Is the Critical pH and Why Does a Tooth Dissolve in Acid? *Journal of the Canadian Dental Association* 69:722-724
16. Dawes C, Jenkins GN, Tonge CH (1963) The nomenclature of the integuments of the enamel surface of teeth. *British Dental Journal* 16:65-68
17. Dijkman AG, de Boer P, Arends J (1983) In vivo Investigation on the Fluoride Content in and on Human Enamel after Topical Applications. *Caries Research* 17:392-402
18. Dijkman AG, Tak J, Arends J (1982) Comparison of Fluoride Uptake by Human Enamel from Acidulated Phosphate Fluoride Gels with Different Fluoride Concentrations. *Caries Research* 16:197-200
19. Duckworth RM, Knoop DTM, Stephen W (1991) Effect of Mouthrinsing after Toothbrushing with a Fluoride Dentifrice on Human Salivary Fluoride Levels. *Caries Research* 25:287-291
20. Edlund K, Koch G (1977) Effect on caries of daily supervised toothbrushing with sodium monofluorophosphate and sodium fluoride dentifrices after 3 years. *Scandinavian Journal of Dental Research* 85:41-45
21. Ekstrand J, Ehrnebo M (1980) Absorption of fluoride from fluoride dentifrices. *Caries Research* 14:96-102
22. Esser M, Tinschert J, Marx R (1998) Materialkennwerte der Zahnhartsubstanz des Rindes im Vergleich zur humanen Zahnhartsubstanz. *Deutsche Zahnärztliche Zeitung* 53:713-717
23. Feagin FF, Sierra O, Thiradilok S, Jeansonne B (1980) Effect of fluoride in remineralized human surface enamel on dissolution resistance. *Journal of Dental Research* 59:1016-1021
24. Featherstone JD (2009) Remineralization, the natural caries repair process- the need for new approaches. *Advances in Dental Research* 21:4-7

25. Featherstone JD, Cutress TW, Rodgers BE, Dennison PJ (1982) Remineralization of Artificial Caries-Like Lesions in vivo by a Self-Administered Mouthrinse or Paste. *Caries Research* 16:235-242
26. Featherstone JD, Mellberg JR (1981) Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Research* 15:109-114
27. Fejerskov O, Thylstrup A, Larsen MJ (1981) Rationale for the use of fluorides in caries prevention. A concept based on possible cariostatic mechanisms. *Acta Odontologica Scandinavica* 39:241-249
28. Fernández CE, Fontana M, Samarian D, Cury JA, Rickard AH, González-Cabezas C (2016) Effect of Fluoride-Containing Toothpastes on Enamel Demineralization and Streptococcus mutans Biofilm Architecture. *Caries Research* 50:151-158
29. Fitzgerald RJ, Keyes PH (1960) Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *Journal of the American Dental Association* 61:9-19
30. Gaffar A, Blake-Haskins J, Mellberg J (1993) In vivo studies with a dicalcium phosphate dihydrate/MFP system for caries prevention. *International Dental Journal* 43:81-88
31. Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B, Schwenzer N, Ehrenfeld M (2010) Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
32. Gao SS, Zhang S, Mei ML, Lo EC, Chu CH (2016) Caries remineralisation and arresting effect in children by professionally applied fluoride treatment-a systematic review. *BMC Oral Health* 16:12
33. González-Cabezas C, Jiang H, Fontana M, Eckert GJ (2012) Effect of low pH on surface rehardening efficacy of high concentration fluoride treatments on non-cavitated lesions. *Journal of Dentistry* 40:522-600
34. Griffin SO, Regnier E, Griffin PM, Huntley V (2007) Effectiveness of Fluoride in Preventing Caries in Adults. *Journal of Dental Research* 86:410-415
35. Grøn P (1977) Chemistry of topical fluorides. *Caries Research* 11:172-204
36. Hamilton IR (1990) Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *Journal of Dental Research* 69:660-667

37. Hannig C, Hannig M (2009) The oral cavity-a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clinical Oral Investigations* 13:123-139
38. Hannig M, Joiner A (2006) The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monographs in Oral Science* 19:29-64
39. Hellwege KD (2013) Die Praxis der Zahnmedizinischen Prophylaxe. Thieme, Stuttgart New York
40. Hellwig E, Klimek J, Albert G (1989) In-vivo Retention angelagerten und fest gebundenen Fluorids in demineralisiertem Zahnschmelz. *Deutsche Zahnärztliche Zeitung* 44:173-176
41. Hellwig E, Klimek J, Attin T (2013) Einführung in die Zahnerhaltung Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln
42. Holler BE, Friedl KH, Jung H, Hiller KA, Schmalz G (2002) Fluoride uptake and distribution in enamel and dentin after application of different fluoride solutions. *Clinical Oral Investigations* 6:137-144
43. Horst JA, Tanzer JM, Milgrom PM (2018) Fluorides and Other Preventive Strategies for Tooth Decay. *Dental Clinics of North America* 62:207-234
44. Iheozor-Ejiofor Z, Worthington HV, Walsh T, O'Malley L, Clarkson JE, Macey R, Alam R, Tugwell P, Welch V, Glenny AM (2015) Water Fluoridation for the prevention of dental caries. *Cochrane Database of Systematic Reviews Issue* 6:CD010856
45. Issa AI, Toumba KJ (2004) Oral fluoride retention in saliva following toothbrushing with and without water rising. *Caries Research* 38:9-15
46. Kanduti D, Sterbenk P, Artnik B (2016) Water Fluoridation for the Prevention of Dental Caries. *Materia Socio-medica* 2:133-137
47. Kensche A, Kirsch J, Mintert S, Enders F, Pötschke S, Basche S, König B, Hannig C, Hannig M (2017) Impact of customary fluoride rinsing solutions on the pellicle's protective properties and bioadhesion in situ. *Scientific reports* 7:16584
48. Kensche A, Buschbeck E, König B, Koch M, Kirsch J, Hannig C, Hannig, M (2019) Effect of fluoride mouthrinses and stannous ions on the erosion protective properties of the in situ pellicle. *Scientific reports* 9:5336

49. Keßler JP (2010) In-Situ-Untersuchung der anti-adhäsiven Effekte von Nanokompositbeschichtungen mit Fluorsilanzusatz.
50. Keyes PH (1960) The Infectious and Transmissible Nature of experimental dental caries. Findings and Implications. *Archives of oral biology* 1:304-320
51. Klimek J, Ganß C, Schwan P, Schmidt R (1998) Fluoridaufnahme im Zahnschmelz nach Anwendung von NaF-und AmF-Zahnpasten. *DGZMK: Oralprophylaxe* 4: 192-196
52. Knutson JW, Armstrong WD (1943) The effect of topically applied sodium fluoride on dental caries experience. *Public Health Reports* 58:1701-1715
53. Kuboki Y, Teraoka K, Okada S (1987) X-ray photoelectron spectroscopic studies of the adsorption of salivary constituents on enamel. *Journal of dental research* 66:1016-1019
54. Künzel W (1993) Systemic use of fluoride-other methods: salt, sugar, milk, etc. *Caries Research* 27:16-22
55. Lamkin MS, Arancillo AA, Oppenheim EG (1996) Temporal and Compositional Characteristics of Salivary Protein Adsorption to Hydroxyapatite. *Journal of Dental Research* 75:803-808
56. Linkosalo E, Markkanen H, Syrjänen S (1985) Effects of a lacto-ovo-vegetarian diet on the free amino acid composition of wax-stimulated whole human saliva. *Journal of Nutrition* 115:588-592
57. Litovitz TL, Klein-Schwartz W, Dyer KS, Shannon M, Lee S, Powers M (1998) 1997 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. *American Journal of Emergency Medicine* 16:443-497
58. Luoma H, Nyman A, Toivonen A, Söderholm S, Nuuja T, Kantero RL, Hassinen ML, Jokela M, Nummikoski P, Ranta R, Theskeff I (1979) Effects on caries in mentally handicapped children of addition of fluoride and bicarbonate-phosphate to dietary sugar products. *Scandinavian Journal of Dental Research* 87:197-207
59. Lussi A, Hellwig E, Klimek J (2012) Fluoride-Wirkungsmechanismen und Empfehlungen für deren Gebrauch. *Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin* 122:1037-1042

60. Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S (2003) Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database of systematic Reviews* 1:CD002278
61. Marquis RE (1990) Diminished acid tolerance of plaque bacteria caused by fluoride. *Journal of Dental Research* 69:672-675
62. McCann HG (1953) Reaction of fluoride ion with hydroxyapatite. *Journal of Biological Chemistry* 201:247-59
63. McCann HG (1968) The solubility of fluorapatite and its relationship to that of calcium fluoride. *Archives of Oral Biology*, 13:987-1001
64. Medjedovic E, Medjedovic S, Deljo D, Sukalo A (2015) Impact of fluoride on Dental Health Quality. *Materia Socio-medica* 6:395-398
65. Mellberg JR, Laakso PV, Nicholson CR (1966) The acquisition and loss of fluoride by topically fluoridated human tooth enamel. *Archives of Oral Biology* 11:1213-1220
66. Mellberg JR, Loertscher KLL (1972) Fluoride acquisition in vitro by sound human tooth enamel from sodium fluoride-and ammonium silicofluoride-phosphate solutions. *Archives of Oral Biology* 17:1107-1116
67. Meunier PJ (1990) The treatment of vertebral osteoporosis. Use of sodium fluoride and sodium monofluorophosphate in combination with calcium. *Fortschritte der Medizin* 108:45-48
68. Mullane O, Baez RJ, Jones S, Lennon MA, Petersen PE, Rugg-Gunn AJ, Whelton H, Whitford GM (2016) Fluoride and oral health. *The Community Dental Health Journal* 33:69-99
69. Müller F, Zeitz C, Mantz H, Ehses KH, Soldera F, Schmauch J, Jacobs K (2010) Elemental Depth Profiling of Fluoridated Hydroxyapatite: Saving Your Dentition by the Skin of Your Teeth? *Langmuir* 26:18750-18759
70. Nakamichi J, Iwaku M, Fusayana T (1983) Bovine Teeth as Possible Substitutes in the Adhesion Test. *Journal of Dental Research* 62:1076-1081
71. Naujoks R (1983) Effizienz und Ökonomie der Anwendungsformen von Fluoriden: Zahnpasten. *Deutsche Zahnärztliche Zeitung* 38:61-63
72. Øgaard B (2001) CaF₂ Formation: Cariostatic Properties and Factors of Enhancing the Effect. *Caries Research* 35:40-44

73. Øgaard B, Rølla G, Arends J, ten Cate JM (1988a) Orthodontic appliances and enamel demineralization. Prevention and treatment of lesions. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 94:123-127
74. Øgaard B, Rølla G, Ruben J, Dijkman T, Arends J (1988b) Microradiographic study of demineralization of shark enamel in a human caries model. *Scandinavian Journal of Dental Research* 96:209-2011
75. Oronsky B, Goyal S, Kim MM, Cabrales P, Lybeck M, Caroën S, Oronsky N, Burbano E, Carter C, Oronsky A (2018) A review of clinical radio protection and chemoprotection for oral mucositis. *Translational Oncology* 11:771-778
76. Parkinson CR, Siddiqi M, Mason S, Lippert F, Hara AT, Zero DT (2017) Anticaries Potential of a Sodium Monofluorophosphate Dentifrice Containing Calcium Sodium Phosphosilicate: Exploratory in situ Randomized Trial. *Caries Research* 51:170-178
77. Patz J (1975) Pharmakokinetische Untersuchungen zum Fluoridstoffwechsel. Thieme, Stuttgart
78. Pearce EIF, Jenkins GN (1976) The inhibition of acid production in human saliva by monofluorophosphate. *Archives of Oral Biology* 10:617-621
79. Petzold M (2001) The Influence of Different Fluoride Compounds and Treatment Conditions on Dental Enamel: A Descriptive in vitro Study of the CaF₂ Precipitation and Microstructure. *Caries Research* 35:45-51
80. Plangsangmas T, Brown JL, Thitaram C, Silva-Fletcher A, Edwards KL, Punyapornwithaya V, Somgird C (2020) Circadian Rhythm of Salivary Immunoglobulin A and Associations with Cortisol as A Stress Biomarker in Captive Asian Elephants. (*Elephas maximus*) *Animals* 10:157
81. Quirynen M, Bollen C (1995) The influence of surface roughness and surface-free energy on supra-and subgingival plaque formation in man. *Journal of Clinical Periodontology* 22:1-14
82. Rae JJ, Clegg CT (1945) The effect of sodium fluoride on the solubility of calcium phosphate, tooth enamel and whole teeth in lactic acid. *Journal of Dental Research* 24:235-237
83. Rieben A, Kielbassa AM (2006). Megatrend Prophylaxe-Auf Du und Du mit den Fluoriden. *Dentalhygiene Journal* 9:22-26

84. Rinderer L, Schait A, Mühlemann HR (1965) Loss of fluoride from dental enamel after topical fluoridation (preliminary report). *Helv Odontol Acta* 9:148-150
85. Rølla G, Ekstrand J (1996) Fluoride in oral fluids and dental plaque. Fluoride in dentistry. Munksgaard, Copenhagen
86. Rošin-Grget K (2013) The cariostatic mechanisms of fluoride. *Acta Medica Academica* 42:179-188
87. Rugg-Gunn A, Bánóczy J (2013) Fluoride toothpastes and fluoride mouthrinses for home use. *Acta Medica Academica* 42:168-178
88. Saporito RA, Boneta AR, Feldman CA, Cinotti W, Sintes JL, Steward B, Volpe AR, Proskin HM (2000) Comparative anticaries efficacy of sodium fluoride and sodium monofluorophosphate dentifrices. A two-year caries clinical trial on children in New Jersey and Puerto Rico. *American journal of dentistry* 13:221-226
89. Saxegaard E, Rølla G (1989) Kinetics of acquisition and loss of calcium fluoride by enamel in vivo. *Caries Research* 23:406-411
90. Scholz KJ, Federlin M, Hiller KA, Ebensberger H, Ferstl G, Buchalla W (2019) EDX-analysis of fluoride precipitation on human enamel. *Scientific Reports* 9:13442
91. Schröder H (1992) *Orale Strukturbiologie*, Thieme Stuttgart, New York
92. Seppä L, Pöllänen L, Hausen H (1994) Caries-preventive effect of fluoride varnish with different fluoride concentrations. *Caries Research* 28:64-67
93. Setnikar I, Arigoni R (1988) Chemical stability and mode of gastrointestinal absorption of sodium monofluorophosphate. *Arzneimittelforschung* 38:45-49
94. Sjøgren K, Birkhed D (1993) Factors related to fluoride retention after toothbrushing and possible connection to caries activity. *Caries Research* 27:474-477
95. Skjørland KK, Rykke M, Sønju T (1995) Rate of pellicle formation in vivo. *Acta odontologica Scandinavica*, 53:358-362
96. Slade GD, Grider WB, Maas WR, Sanders AE (2018) Water Fluoridation and Dental Caries in U.S. Children and Adolescents. *Journal of Dental Research* 97:1122-1128
97. Slomiany BL, Murty VLN, Mandel ID, Sengupta S, Slomiany A (1990) 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. *Archives of Oral Biology* 35:175-180

98. Sreebny LM, Schwartz S (1997) A reference guide to drugs and dry mouth-2nd edition. *Gerodontology* 14:33-47
99. Stack MV (1967) Chemical organization of the organic matrix of enamel. Structural and Chemical Organization of teeth. Academic Press, New York
100. Stephen K, Boyle I, Campbell D (1981) A 4-year double-blind fluoridated school milk study in a vitamin-D deficient area. *British Dental Journal* 151:287-292
101. Stone RW, Werkman CH (1937) The Occurrence of Phosphoglyceric Acid in the Bacterial Dissimilation of Glucose. *Biochemical Journal* 31:1516-1523
102. Stookey GK, DePaola PF, Featherstone JD, Fejerskov O, Möller IJ, Rotberg S, Stephen KW, Wefel JS (1993) A critical review of the relative anticaries efficacy of sodium fluoride and sodium monofluorophosphate dentifrices. *Caries Research* 27:337-360
103. Sullivan R, Rege A, Corby P, Klaczany G, Allen K, Hershkowitz D, Goldder B, Wolff M (2014). Evaluation of a dentifrice containing 8% arginine, calcium carbonate, and sodium monofluorophosphate to repair acid-softened enamel using an intra-oral remineralization model. *The Journal of clinical dentistry* 25:A14-A19
104. ten Cate JM, Duijsters PPE (1983) Influence of Fluoride in Solution on Tooth Demineralization. *Caries Research* 17: 513-519
105. ten Cate JM, Jongebloed WL, Arenas J (1981) Remineralization of Artificial Enamel Lesions in vitro. *Caries Research* 15:60-69
106. Topping G, Assaf A (2005) Strong evidence that daily use of fluoride toothpaste prevents caries. *Evidence-Based Dentistry* 6:32
107. Twetman S (2009) Caries prevention with fluoride toothpaste in children: an update. *European Archives of Pediatric Dentistry* 10:162-167
108. Vassilakos N, Arnebrant T, Glantz PO (1993) An in vitro study of salivary film formation at solid/liquid interfaces. *Scandinavian Journal of Dental Research* 101:133-137
109. Vassilakos N, Arnebrant T, Rundegren J, Glantz PO (1982) In vitro interactions of anionic and cationic surfactants with salivary fractions on well-defined solid surfaces. *Acta Odontologica Scandinavica* 50:179-188

110. Volpe AR, Petrone ME, Davies R, Proskin HM (1995) Clinical anticaries efficacy of NaF and SMFP dentifrices: overview and resolution of the scientific controversy. *Journal of Clinical Dentistry* 6:1-28
111. Wahab FK, Shellis RP, Elderton RJ (1993) Effects of low fluoride concentrations on formation of caries-like lesions in human enamel in a sequential-transfer bacterial system. *Archives of Oral Biology* 38:985-995
112. Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VCC, Shi X (2010) Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane database of systematic reviews*. 1:CD007868
113. Walsh T, Worthington HV, Glenny AE, Marinho V, Jeronic A (2019) Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. *Cochrane Database of systematic Reviews*, 3:CD007868
114. Wiegand A, Waldheim E, Sener B, Magalhaes AC, Attin T (2009) Comparison of the Effects of TiF 4 and NaF Solutions at pH 1.2 and 3.5 on Enamel Erosion in vitro. *Caries Research* 43:269-277
115. Wong MC, Clarkson J, Glenny AM, Lo EC, Marinho VC, Tsang BW, Walsh T, Worthington HV (2011) Cochrane reviews on the benefits/risks of fluoride toothpastes. *Journal of Dental Research* 90:573-579
116. Yao Y, Lamkin MS, Oppenheim FG (1999) Pellicle precursor proteins: acidic proline-rich proteins, statherin, and histatins, and their crosslinking reaction by oral transglutaminase. *Journal of dental research* 78:1696-1703
117. Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ (1976) Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. *Journal of Dental Research* 55:664-70

8 Danksagung

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hannig, Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde des Universität des Saarlandes, für die Bereitstellung des Themas, die stets konstruktive Kritik und die fachlichen Hinweise.

Meiner Betreuerin Frau PD Dr. Dudek danke ich besonders für ihre Geduld, ihr großes Engagement sowie für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche und für das Lesen und Korrigieren meiner Dissertation.

Herrn Norbert Pütz danke ich für seine Unterstützung bei der Erstellung und Auswertung der mikroskopischen Bilder.

Weiterhin gilt ein riesiger Dank meinen vier Probanden für das Tragen der Schienen, ohne die es nicht möglich gewesen wäre, meine *Ex situ*-Versuche durchzuführen.

Ich danke meiner Familie, meinem Partner Yannick und meinen Freunden für die liebevolle Unterstützung sowie die Ermutigung während meines Studiums und dieser Dissertation.

Die Untersuchungen erfolgten mit finanzieller Unterstützung durch die DFG (SFB 1027).

9 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

10 Anhang

10.1 Übersicht aller Materialien und Geräte

Chemikalien

Aqua B. Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Isopropylalkohol	2-Propanol 70 %, Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken
Natriumhypochloridlösung	Natriumhypochlorid-Lösung 3 % DAC, Aug Hedinger Hedinger GmbH & Co KG, Stuttgart
Natriumfluorid	Ferdinand Kreutzer Sabamühle GmbH, Nürnberg
Natriummonofluorophosphat	Omya Schweiz AG, Oftringen
Salzsäure (HCl 37 %)	Emsure Merck, Darmstadt
Thymollösung	Thymol 0,1 % Lösung, Apotheke im UKS, Homburg

Verbrauchsmaterialien und Geräte

Alginat	Palgat Plus, 3M ESPE GmbH, Seefeld
Auflichtmikroskop	Zoom-Stereomikroskope SMZ 140, Motic GmbH, Wetzlar
Befestigungssilikon	President light body, Coltène/Whaledent GmbH und Co. KG, Langenau
Diamanttrennscheibe	Schleiftrennmaschine WOCO 50p, Conrad GmbH, Clausthal
Duran®-Folien	Scheu-Dental, Iserlohn
Kohlegarn	Plano GmbH, Wetzlar

Anhang

Leit-Tabs	Plano GmbH, Wetzlar
Nassschleifgerät	Buehler GmbH, Phoenix 3000, Düsseldorf
Papierwisch Tuch, fusselfarm	Kimtech Science, Kimberly-Clark Professional, Roswell, Georgia, USA
pH-Meter	Schott Instruments GmbH, Mainz
Probenteller aus Aluminium	Specimen Stubs, Agar Scientific Ltd., Essex, UK
Rasterelektronenmikroskop	XL 30 ESEM FEG, FEI Company, Eindhoven, Niederlande
Säge	Conrad Apparatebau GmbH, Clausthal-Zellerfeld
Sputter-Coater	SCD 030, Lichtenstein
Superhartgips Klasse IV	Die-Stone Peach Klasse IV-Gips, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau
Tiefziehverfahren	Erkopress ES 2004, Erkodent GmbH, Pfalzgrafenweiler
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 H, Bandelin, Berlin
Zellkulturplatte x-well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen