

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

Modifizierung des initialen Biofilms durch natürliche Extrakte in-situ

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der theoretischen Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von:

Nazife Yazdani Badabi

geb. am: 07.07.1989 in Ottweiler

Tag der Promotion: 19.04.2021

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hannig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hoth

Widmung

Meinen Eltern in Dankbarkeit und Liebe gewidmet

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bidest.	bidestilliert
bzw.	beziehungsweise
°C	Celsius
ca.	circa
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
h	Stunden
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
LDS-Puffer	Lithiumdodecylsulfat-Puffer
M	molar
m	Masse
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorit
nm	Nanometer
p.a.	pro analysi
pH	Potential of hydrogen
ppm	parts per million

REM	Rasterelektronenmikroskopie
s	Sekunde
sec	Seconds
SEM	Scanning electron microscopy
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
z.B.	zum Beispiel
μ l	Mikroliter
%	Prozent
x g	relative Zentrifugalkraft

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	I
Inhaltsverzeichnis.....	III
1 Zusammenfassung.....	1
1.1 Deutsche Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	2
2 Einleitung	4
2.1 Die Erosion.....	4
2.2 Die Pellikel.....	6
2.2.1 Initiale Biofilmbildung.....	6
2.2.2 Funktion der Pellikel	7
2.3 Bakterielle Biofilmbildung.....	9
2.4 Modifizierung der Pellikel durch Naturextrakte	10
2.4.1 Tanninsäure	12
2.4.2 Chitosan.....	13
2.4.3 Experimentelles Hopfenextrakt.....	15
2.5 Ziel der Studie/ Fragestellung	17
3 Material und Methoden	19
3.1 Probanden.....	19
3.2 Gewinnung und Herstellung von Prüfkörper aus Zahnhartsubstanz.....	19
3.3 Herstellung von Prüfkörpertrageschienen	21
3.4 Spüllösungen	22
3.5 Versuchsreihen	23
3.5.1 Erosionsschutz.....	23
3.5.1.1 Proben für die TEM-Analysen.....	23
3.5.1.2 Proben für die REM-Analysen.....	26

3.5.2	Überprüfung der chemischen Stabilität der Pellikel durch Elutionsprotokolle..	28
3.5.2.1	Elutionsprotokoll mit Triton/RIPA.....	30
3.5.2.2	Elutionprotokoll zusätzlich mit Glasbeads	30
3.5.2.3	Elutionprotokoll zusätzlich mit EDTA	30
3.5.2.4	Elutionprotokoll zusätzlich mit Ultraschall	31
3.5.2.4.1	Triton/RIPA-Gemisch mit einer Ultraschallsonde.....	31
3.5.2.4.2	Triton- bzw. RIPA-Puffer mit einer Ultraschallsonde	31
3.5.2.5	Doppelte Konzentration von Triton/RIPA	31
3.5.2.6	Verlängerung der Inkubationszeit in RIPA/Triton	32
3.5.2.7	Elution mit LDS-Puffer.....	32
3.6	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	33
3.6.1	Fixierung der Proben.....	33
3.6.2	Entwässerung bis zum Araldit-Aceton-Gemisch mit 3 % Beschleuniger.....	33
3.6.3	Umsetzen in reines Araldit-Gemisch mit 2 % Beschleuniger	34
3.6.4	Umsetzen in Silikonformen mit Araldit-Gemisch mit 2 % Beschleuniger	34
3.6.5	Herstellen der Ultradünnschnitte.....	34
3.7	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	36
3.7.1	Fixierung der Proben.....	36
3.7.2	Entwässerung und Vorbereitung der Proben	36
3.7.3	Untersuchung der Biofilme	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Erosionsschutz.....	38
4.1.1	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	38
4.1.1.1	In-situ-Spülung mit Wasser.....	39
4.1.1.2	In-situ-Spülung mit Tanninsäure.....	41
4.1.1.3	In-situ-Spülung mit Chitosan.....	43
4.1.1.4	In-situ-Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt	45

4.1.2	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	48
4.1.2.1	Kontrolle ohne Pellikel	49
4.1.2.2	In-situ-Spülung mit Wasser	50
4.1.2.3	In-situ-Spülung mit Tanninsäure	55
4.1.2.4	In-situ-Spülung mit Chitosan	60
4.1.2.5	In-situ-Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt	65
4.1.3	Überprüfung der chemischen Stabilität der Pellikel	70
5	Diskussion	74
5.1	Diskussion von Material und Methoden	74
5.1.1	Studiendesign und Fragestellung	74
5.1.2	Gewinnung und Herstellung von Schmelzprüfkörpern	74
5.1.3	Pellikelbildung	75
5.1.4	Probandenselektion	76
5.1.5	Versuchsbedingungen	76
5.1.5.1	Chemische Elution	78
5.2	Diskussion der Ergebnisse	79
5.2.1	Erosionsschutz	79
5.2.2	Überprüfung der chemischen Stabilität der Pellikel	81
5.2.3	Antiplaquemittel	83
5.3	Schlussfolgerungen / Konklusionen	84
6	Literaturverzeichnis	85
7	Danksagung	96
8	Lebenslauf	97
9	Anhang	100
9.1	REM Analysen: Proband 2, Spülung mit Wasser	100
9.2	REM Analysen: Proband 2, Spülung mit Tanninsäure (10 mg/ml)	101
9.3	REM Analysen: Proband 2, Spülung mit Chitosan (5 mg/ml)	102

9.4	REM-Analysen: Proband 2, Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt.....	103
9.5	REM-Analysen: Proband 3, Spülung mit Wasser	104
9.6	REM-Analysen: Proband 3, Spülung mit Tanninsäure (10 mg/ml)	105
9.7	REM-Analysen: Proband 3, Spülung mit Chitosan (5 mg/ml)	106
9.8	REM-Analysen: Proband 3, Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt.....	107
9.9	Lösungen	108

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Die Zahnerosion wird als der säurebedingte Verlust von Zahnhartsubstanz definiert. In erster Linie entstehen Erosionen aus nichtbakteriellem chemischem Angriff, in der Regel durch saure Speisen oder Getränke. Die Prävalenz der Zahnerosion ist stetig am Steigen. Der initiale Biofilm (Pellikel), welcher durch selektive Adsorption von Speichelproteinen auf dem Zahnschmelz gebildet wird, hat eine große Bedeutung für den Schutz der Zähne. Ein möglicher präventiver Ansatz zum Schutz der Zähne ist die Modifizierung der Pellikel durch Naturextrakte, die als Spüllösungen angewendet werden können. Eine Modifizierung des initialen Biofilms durch Naturextrakte könnte die Zusammensetzung der Pellikel ändern und dabei die Permeabilität für saure Noxen reduzieren.

Ziele dieser Studie sind durch Modifizierung der Pellikel die Schutzfunktion der Naturextrakte gegen erosiven Mineralverlust zu analysieren und die chemische Stabilität der Pellikel zu untersuchen.

Der Biofilm wurde bukkal 3 min in-situ auf Schmelzprüfkörpern gebildet. Dann wurde die Mundhöhle 30 s mit einer der Spüllösungen (Tanninsäure 10 mg/ml, Chitosan 5 mg/ml und experimentelles Hopfenextrakt) gespült. Zum einen wurden die Schmelzprüfkörper nach unterschiedlichen Tragezeiten für 60 s in Salzsäure inkubiert. Zum anderen wurden verschiedene chemische Elutionsprotokolle durchgeführt, um die Stabilität der modifizierten Pellikel zu untersuchen. Dabei wurden Ultrastruktur und Säurebeständigkeit des Biofilms mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) analysiert.

Nach der Verwendung von natürlichen Extrakten wurden morphologische Veränderungen der Pellikel mittels TEM und REM deutlich sichtbar. Die Dichte der Pellikel war nach der Nutzung der Spüllösungen im Vergleich zu der Wasserkontrolle erhöht. Die schützende Eigenschaft dieser proteinhaltigen Schicht gegen die Demineralisierung und die Verstärkung dieser Eigenschaft durch die Modifizierung mit verschiedenen Naturextrakten wurden durch die in-situ-Versuche gezeigt. Außerdem wurde durch Verwendung der natürlichen Extrakte eine Erhöhung der chemischen Stabilität der Pellikel festgestellt. In Abhängigkeit von der Testlösung und Tragezeit reichten die erosiven Veränderungen von der initialen Demineralisierung bis hin zum vollständigen Verlust der äußeren Schmelzschicht unter Freilegung der Schmelzprismenstruktur. Trotz der interindividuellen Schwankungen wurde

eine Säureresistenz von den behandelten Proben mit einem experimentellen Hopfenextrakt nach 30 min Tragezeit gezeigt. Tanninsäure (10 mg/ml) verursachte aufgrund der Denaturierung von Pellikelproteinen ebenfalls eine elektronendichtere Pellikel im Vergleich zur Wasserkontrolle. Der Kontakt mit Chitosan (5 mg/ml) verursachte eine Zunahme der Pellikeldicke, die sogar nach 30 minütiger intraoraler Exposition verstärkt wurde.

Die untersuchten Naturextrakte bewirkten ultrastrukturelle Pellikelveränderungen. Die dadurch induzierte Pellikelverdickung kann die schützenden Eigenschaften verbessern. Es lässt sich schlussfolgern, dass durch Spülungen mit Naturextrakten die chemische Stabilität der Pellikel erhöht wird und ein Schutzeffekt gegenüber der Erosion erzielt wird. Allerdings kann die erosive Wirkung nicht vollständig verhindert werden. In Zukunft sollten in Bezug auf den schützenden Effekt von Naturstoffen gegen Erosionen auf dem Schmelz noch weitere Untersuchungen erfolgen.

1.2 Abstract

Dental erosion is defined as the loss of tooth structure caused by an acidic diet. Its prevalence is still increasing. The initial biofilm (pellicle) - resulting from the selective adsorption of salivary proteins to the enamel - plays an important role in tooth protection. Plant extracts as rinsing solutions are a possible approach to improve the protective properties of the pellicle. Changes of the pellicle's composition after rinsing with different plant extracts can reduce the permeability during acidic attack.

Aims of this work are to investigate the influence of these plant extracts on the protective property of the pellicle against mineral loss and to study the chemical stability of the modified pellicle.

First, the pellicle was formed in-situ on enamel specimens for 3 min. Then we performed a 30 sec mouth rinsing with one of the plant solutions (tannic acid 10 mg/ml, chitosane 5 mg/ml, experimental hop extract). On the one hand, the specimens were incubated after different intraoral exposure times for 60 sec in hydrochloric acid. On the other hand, different elution protocols were analyzed to investigate the stability of the modified pellicle. Ultrastructure and acid resistance of the biofilm were evaluated by transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM).

After using natural extracts morphological changes of the pellicles were clearly visible by TEM and REM. In comparison to the control (water rinsing), the rinsing with the natural extract led to an increased biofilm density and higher resistance to acids. The protective property of this against demineralization and enhancement of this property by modification with various natural extracts was demonstrated by in situ experiments. In addition, an increase in the chemical stability of the pellicles was found by using the natural extracts. Depending on the test solution and intraoral exposure time, the erosive changes ranged from the initial demineralization to the complete loss of the outer enamel layer exposing the enamel prism structure. Despite interindividual fluctuations, an acid resistance of experimental hop extract was shown after 30 min intraoral exposure time. Tannic acid (10 mg/ml) also caused more electron-dense pellicles compared to water control, due to the denaturation of pellicle proteins. Treatment with chitosan (5 mg/ml) caused an increase in pellicle thickness, which was exacerbated even 30 minutes after in situ exposure.

Various natural extracts showed ultrastructural pellicle changes. The different rinses showed an acid-protective effect compared to the control rinse. The induced pellicle thickening can positively alter the protective properties of the pellicles against tooth wear. Modification of the pellicle increases the chemical stability and has a protective effect against erosion. However, the erosion can not be completely prevented. Further investigations should be performed in future considering the protective effect of natural products against erosion on the enamel.

2 Einleitung

2.1 Die Erosion

Die Zahnerosion wird als der Verlust von Zahnhartsubstanz definiert. Wie in vielen epidemiologischen Studien gezeigt, steigt die Prävalenz der Zahnerosion weiter (HANNIG et al., 2012; JAEGGI, LUSSI, 2014). Erosion ist ein pathologischer Prozess. Die Hauptursache ist der nicht-bakterielle, chemische Angriff, in der Regel durch saure Substanzen (ZERO, 1996). Die Säuren können aus endogenem oder exogenem Ursprung sein. Das ständige Einwirken von Säuren auf die Schmelzoberfläche führt zu einem Verlust von Zahnhartsubstanz. Bei diesem chronischen und schmerzlosen Prozess kommt es zu einer Auflösung des Schmelzes, die im fortgeschrittenen Stadium auch bis ins Dentin reicht (SCHWEIZER-HIRT et al., 1978) und sich zu einer schmerzhaften Hypersensitivität entwickeln kann (ABSI et al., 1992).

Bei der Entstehung von Erosionen sind drei modifizierende Faktoren beteiligt. Sie lassen sich in chemische, biologische und individuelle Faktoren einteilen (LUSSI et al., 2004). Die chemischen Faktoren beziehen sich auf die Eigenschaften der jeweiligen Lebensmittel. Zu exogenen Säuren zählen der hohe Konsum säurehaltiger Nahrungsmittel, die häufige Einnahme bestimmter Medikamente wie Aspirin bzw. Acetylsalicylsäure (MCCRACKEN, O'NEAL, 2000), Beruhigungsmittel, Antihistaminika und Antiemetika (LUSSI et al., 2004; MOAZZEZ, BARTLETT, 2014; ZERO, 1996). Es ist schon sehr lange bekannt, dass säurehaltige Lebensmittel und Getränke Erosionen hervorrufen können (LUSSI et al., 2002). Einige Getränke können pH-Werte im Bereich von 2 bis 3 haben. Der Säureangriff führt zu einem irreversiblen Verlust der äußersten Zahnschmelz- und Dentinschichten und zu einer teilweisen Entmineralisierung der Zahnoberfläche (ATTIN et al., 2005a). Das erosive Potential eines sauren Getränks hängt von der Stärke der Säure, Pufferkapazität, der Möglichkeit einer Komplexbildung und von der Kalzium-, Phosphat- und Fluoridkonzentration des Produktes ab (LUSSI, 2006). Der extensive Konsum säurehaltiger Lebensmittel zählt zu dem wichtigsten ätiologischen Faktor in der Entstehung und Progression von Erosionen (JARVINEN et al., 1991; LUSSI, SCHAFFNER, 2000) und ist somit der Hauptgrund für die zunehmende Verbreitung von Zahnerosion (LUSSI et al., 2002).

Die biologischen Faktoren beinhalten den Speichel (die Zusammensetzung, der pH-Wert, die Fließrate sowie die Pufferkapazität) und die Zahnstellung. In-vitro und in-situ wurde gezeigt, dass auch die Bildung eines initialen Biofilms, genannt Pellikel, die darunterliegende Zahnhartsubstanz in einem gewissen Maße vor einem Säureangriff schützen kann (AMAECHI et al.,

1999; HANNIG, BALZ, 1999; MEURMAN, FRANK, 1991). Außerdem spielen die endogenen Säuren in der biologischen Gruppe eine Rolle. Hier zählt man z.B. die Magensäure mit einem pH-Wert von 1, die durch Reflux Erkrankungen oder durch Bulimia nervosa in den Mundraum gelangen kann. In einer früheren Studie wurden Patienten mit gastrointestinalen Störungen auf Erosionen hin untersucht. Patienten mit gastrointestinalem Reflux und Duodenalulkus hatten ein höheres Risiko irreversible Zahnschäden durch Erosionen zu bekommen als gesunde Patienten (JARVINEN et al., 1988).

Zur dritten Gruppe, die sich auf das individuelle Verhalten bezieht, gehören das Ess- und Trinkverhalten, wie z.B. das lange Belassen von sauren Getränken in der Mundhöhle und nächtliches Trinken von säurehaltigen Getränken. Ein gesunder Lebensstil (100 % Frucht- und Gemüsesäfte) führt ebenfalls zu einem schnellen Anstieg der Zahnerosion (EHLEN et al., 2008; LUSI et al., 2004). Eine exzessive Mundhygiene mit abrasiven Zahnpasten (MOAZZEZ, BARTLETT, 2000; ZERO, 1996) kann auch die Entstehung einer Erosion begünstigen.

Diese vermeidbaren Krankheiten sind weit verbreitet und bleiben für einen großen Teil der Bevölkerung ein Gesundheitsproblem. Die Zunahme von Erosionen ist in der älteren Bevölkerung stärker zu beobachten als bei der jüngeren Bevölkerung (LUSI, SCHAFFNER, 2000). Aufgrund des erheblichen Anstieges von Erosionen gewinnt sie in der Zahnmedizin vermehrte Bedeutung. Somit gibt es weiterhin einen Bedarf für wirksame Präventionsstrategien.

2.2 Die Pellikel

2.2.1 Initiale Biofilmbildung

Speichel besteht zu 99 % aus Wasser, zu 0,5 % aus löslichen Stoffen (anorganisch 0,2 %, organisch 0,3 %) und zu 0,1 % aus unlöslichen Stoffen (desquamierte Epithelzellen, Leukozyten, Speisereste und Bakterien). Zu den organischen Stoffen gehören zum Beispiel Proteine, Enzyme, Lipide und Antikörper. Speichel hat verschiedene Funktionen. Viele Proteine im Speichel sorgen unter anderem für die Aufrechterhaltung der Mundgesundheit z.B. Lysozym, Amylase, Mucin oder Immunoglobuline. Aufgrund vom enthaltenen Bikarbonat weist Speichel eine Pufferkapazität auf. Außerdem besitzt Speichel auch kalziumbindende Proteine z.B. Statherin oder Histatin, welche für die Biofilmbildung eine große Rolle spielen.

Der Zahnschmelz besteht zu 99 % aus mineralischen Kalziumphosphatkristallen (Hydroxyapatit). Kalzium ist bis zu 34-39 % m/m (Trockengewicht) und Phosphor bis zu 16-18 % m/m (Trockengewicht) enthalten (ATTIN et al., 2005b).

Die Biofilmbildung erfolgt in zwei Schritten. Der erste Schritt erfolgt einige Sekunden nach der Mundhygiene durch Adsorptionsprozesse der Proteine (HANNIG, HANNIG, 2009). Die kontinuierliche Adsorption von Makromolekülen an der Phasengrenze (Schmelz, Speichel) kommt primär durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ/ positiv geladenen Zahnoberfläche (Kalzium- und Phosphatgruppen) und den entsprechend entgegengesetzt positiv/ negativ geladenen Gruppen von Speichelproteinen zustande. Andere Kräfte tragen auch zur Bindung der Proteine an der Zahnoberfläche bei, wie z.B. van der Waals-Wechselwirkungen, hydrophobe Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen (HANNIG, JOINER, 2006). Die initiale Pellikel ist eine dünne, azelluläre Schicht und enthält überwiegend Speichelproteine, Peptide, Kohlenhydrate, Lipide, sowie Bestandteile der Sulkusflüssigkeit (HANNIG, JOINER, 2006; SIQUEIRA et al., 2007a). Auch die Ernährung kann die Zusammensetzung der Pellikel beeinflussen (RYKKE, SONJU, 1991; VACCA SMITH, BOWEN, 2000; VAN DER MEI et al., 2002). Aufgrund der unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten konnten Unterschiede in der Zusammensetzung der Pellikel gezeigt werden (HANNIG, JOINER, 2006). Nahrungsbestandteile wie z.B. Polyphenole, Lipide, oder Casein können in die Pellikel eingelagert werden (BARBOUR et al., 2008; CHEAIB, LUSSI, 2011; HEMINGWAY et al., 2010; JOINER et al., 2003; KENSCHKE et al., 2013; WHITE et al., 2011).

Die Pellikel besteht aus einer elektronendichten basalen Schicht und aus einer losen

Deckschicht (HANNIG, JOINER, 2006). Die basale Schicht ist eine kontinuierliche, homogen strukturierte, feinkörnige und elektronendichte Schicht mit einer Dicke von 10-20 nm, die bereits in-situ in der über eine Minute gebildeten Pellikel erkannt wurde (HANNIG, 1999). Die äußere Schicht variiert in der Dicke und Struktur abhängig von der Bildungszeit, sowie intraoralen Lage und zeigt individuelle Unterschiede (HANNIG, JOINER, 2006; SIQUEIRA et al., 2012).

Die zweite Stufe ist der Reifeprozess, der durch kontinuierliche Adsorption von Biopolymeren aus dem Speichel auf die Pellikel über Protein-Protein-Wechselwirkungen charakterisiert ist. Dies erfolgt innerhalb von einigen Stunden (HANNIG, JOINER, 2006). Die "Reifung" führt mit der Zeit zu morphologischen Veränderungen. Die "junge" Pellikel (2 h) zeigt eine ungleichmäßige und unvollständige organische Bedeckung der Zahnoberfläche. Auf der bukkalen Seite zeigt die 2 h-Pellikel eine große ultrastrukturelle Vielfalt. Diese enthält sowohl granuläre und globuläre Komponenten. Die Pellikeldicke variiert zwischen 100 nm und 500 nm (HANNIG, 1999). Im Gegensatz dazu enthält die 2 h-Pellikel palatinal nur granuläre Komponenten und verfügt über unterschiedliche Dicken zwischen 20 nm und 80 nm. Die "reife" Pellikel (mehrere Stunden oder Tage) zeigt kompaktere Schichten. Nach 24 h bildet sich eine dichte und homogene Schicht oberhalb der dichten basalen Schicht. Die Dicke der Pellikel auf der bukkalen Seite erhöht sich auf 1000 nm bis 1300 nm, während die Dicke der Pellikel auf der palatinalen Seite auf 100 nm bis 200 nm steigt (HANNIG, 1999).

2.2.2 Funktion der Pellikel

Der initiale Biofilm hat sowohl positive als auch negative Eigenschaften. Zahlreiche Studien zeigen, dass die oralen Mikroorganismen nicht direkt auf der Zahnoberfläche haften, sondern auf der Pellikelschicht (HANNIG, JOINER, 2006). Die anfängliche mikrobielle Biofilmbildung wird durch die bereits gebildete Pellikel geregelt (HANNIG et al., 2007). Viele Proteine der Pellikel dienen als Rezeptoren für das spezifische Anhaften von Bakterien (WHITTAKER et al., 1996) und führen zu weiterer bakterieller Anhaftung und Biofilmmreifung (HANNIG, JOINER, 2006). Mikroorganismen besiedeln die Pellikel und dies führt zu einem mikrobiellen Biofilm (Plaque) (COSTERTON, 1995; MARSH, 1999, 2005). Nur der reife mikrobielle Biofilm führt zu Karies und zu Zahnfleischentzündungen (MARSH, 2005; MOORE WE, 1994; WOLFF, LARSON, 2009). Somit hat die Pellikel einen destruktiven Charakter. Selbst innerhalb von 10 Sekunden haften erste Mikroorganismen auf die Pellikel (RONSTROM et al., 1977). Allerdings wird diese beginnende Pellikel mit zufällig einzelnen

Bakterien aufgrund des Fehlens der extrazellulären Matrix nicht als Biofilm angesehen (HANNIG et al., 2007). In der Tat ist es schwierig, eine klare Trennung zwischen der Pellikel und Plaque unter In-vivo-Bedingungen zu machen.

Zu den positiven Eigenschaften zählen unter anderem die protektiven und antibakteriellen Komponenten des initialen Biofilms wie z.B. Lysozym, Lactoferrin, Cystatin oder Histatin (DELIUS et al., 2017). Die Pellikel dient auch als eine semipermeable Barriere zwischen der Zahnoberfläche und der Mundumgebung, die die Prozesse der De- und Remineralisierung des Zahnschmelzes reguliert. Die selektive Durchlässigkeit dieser porösen netzartigen Struktur verzögert und verringert die Demineralisierung durch mikrobielle Säuren. Dies schafft eine schützende Grenzfläche zwischen der Zahnoberfläche und der Mundumgebung. Die schützenden Eigenschaften dieser proteinhaltigen Beschichtung gegen Entmineralisierung wurde in-vitro und in-vivo gezeigt (HANNIG, BALZ, 1999; HANNIG et al., 2004; HANNIG et al., 2003). Im Allgemeinen spielt die Pellikel auch eine wichtige Rolle bei der Lubrikation von Zahnoberflächen. Aufgrund ihrer „Schmiereigenschaften“ reduziert die Pellikel Reibungen zwischen den Zähnen (HANNIG, JOINER, 2006).

Selbst eine 3 min-Pellikel bietet eine vergleichbare Schutzwirkung auf die Schmelzoberfläche gegen Säureangriff wie die Pellikel nach 2 h Reifungszeit (HANNIG et al., 2004). Man geht davon aus, dass der Schutz des Schmelzes vor Erosionen nicht nur von der Dicke sondern auch von der Zusammensetzung der Pellikel bestimmt wird (HANNIG, JOINER, 2006). Sie ist jedoch nicht in der Lage Säureangriffe vollständig zu hindern (HANNIG et al., 2003; SIQUEIRA et al., 2012).

2.3 Bakterielle Biofilmbildung

Das Potential oraler Mikroorganismen an der Schmelzoberfläche zu adhären ist von essentieller Bedeutung für die bakterielle Akkumulation und Proliferation und damit auch für die Pathogenität des mikrobiellen Zahnbelages.

In der Anfangsphase werden Bakterien in der Mundhöhle durch Speichel passiv transportiert und reversibel an der mit Pellikel bedeckten Schmelzoberfläche über physikalisch-chemische Kräfte z.B. mittels van der Waals-Kraft gebunden (HANNIG, JOINER, 2006). Hier sind vor allem die Bakterienfamilie Streptokokken einschließlich *S. mitis* (*Streptococcus mitis*), *S. sanguis* (*Streptococcus sanguis*) und *S. Oralis* (*Streptococcus oralis*) beteiligt (CASSELS et al., 1995; HANNIG, HANNIG, 2009; MCCONNELL et al., 2010). Zu den Erstbesiedlern der Zahnschmelzoberfläche zählen neben den verschiedenen Streptokokkenspezies auch grampositive Stäbchenbakterien z.B. Aktinomyzeten: *A. viscosus* und *A. naeslundii*. Wenn sich Bakterien der Pellikel dicht annähern, kommt es zu stereochemischen Wechselwirkungen und dadurch zu irreversibler Adhäsion (HANNIG, JOINER, 2006). In ähnlicher Weise haften weitere Bakterien durch interbakterielle Wechselwirkungen an primär besiedelten Kolonien und erleichtern die zusätzliche bakterielle Besiedlung. Adhärenz Bakterien vermehren sich und bilden Mikrokolonien. Die Bakterienproliferation spielt für das weitere Biofilmwachstum eine Schlüsselrolle (BRECX et al., 1983).

Die Stufen der Biofilmentwicklung wurden auch von Marsh und Bradshaw (MARSH, BRADSHAW, 1995) wie folgt beschrieben:

1. Die Bildung einer Pellikel auf der Zahnoberfläche
2. Eine nicht-spezifische, reversible Phase mit physikalisch-chemischen Wechselwirkungen zwischen Speichelbakterien und der Pellikel
3. Spezifische Wechselwirkungen zwischen primär kolonisierenden Bakterien der Pellikel
4. Die Adhärenz von sekundär kolonisierenden Bakterien (Co-Aggregation)
5. Die Entwicklung von horizontalen und vertikalen Bakterien-schichten, Matrixbildung, das Wachstum und die Bildung einer Klimaxflora.

2.4 Modifizierung der Pellikel durch Naturextrakte

Heutzutage bieten Mundpflegeprodukte auf dem Markt eine große Vielfalt an Möglichkeiten. Die mechanische Mundhygiene und chemische Plaquekontrolle wurden als prophylaktische Ansätze etabliert. Verschiedene Arten von Fluorid-Zahnputzmitteln und chemische Mundspülungen sind für diesen Zweck gut etabliert (SUNDARAM, BARTLETT, 2001). Der Großteil an Plaque wird mechanisch reduziert und eine dünne Schicht an Zahnbelag bleibt, die weiter chemisch reduziert werden kann (BRECX, 1997). Mundspülungen werden zunehmend genutzt, vor allem als Ergänzung zur täglichen mechanischen oralen Hygiene (JARDIM et al., 2009; SARNER et al., 2012). In einigen Situationen mit den nicht verfügbaren oder nicht anwendbaren mechanischen Ansätzen ersetzen Mundspülungen auch die mechanische Plaquekontrolle, wie bei älteren Menschen mit Behinderungen oder bei Patienten nach Parodontalchirurgie (ELEY, 1999). Bei diesen Risikopatienten, auch solchen die an Refluxerkrankungen litten, konnte durch die Anwendung von Mundspülungen eine Linderung der Erosionen erreicht werden (LUSSI, CARVALHO, 2014). Unter den chemischen Mundspülungen ist Chlorhexidin das effizienteste Mittel gegen Zahnbelag (ADAMS, ADDY, 1994; ADDY, 1986; BRECX, 1997) und wurde als Goldstandard identifiziert (JONES, 1997). Eine Nebenwirkung von Chlorhexidin ist jedoch die Einlagerung von Farbstoffen oder denaturierenden Agenzien in die Pellikel, was zu Verfärbungen von Zähnen und Restaurationen führen kann (HANNIG, JOINER, 2006).

Angesichts der Häufigkeit oraler Erkrankungen, der erhöhten Antibiotikaresistenz von Bakterien, der nachteiligen Auswirkungen einiger derzeit in der Zahnheilkunde verwendeter antibakterieller Mittel und finanzieller Überlegungen in Entwicklungsländern besteht ein Bedarf an alternativen Präventions- und Behandlungsoptionen, die sicher, wirksam und wirtschaftlich sind. Daher wird die Suche nach alternativen Produkten fortgesetzt, die als gute Alternativen zu synthetischen Chemikalien gelten (PRABU et al., 2006).

Heilpflanzen wurden für zahlreiche menschliche Krankheiten seit Tausenden von Jahren und in vielen Teilen der Welt als traditionelle Behandlungen verwendet. In ländlichen Gebieten der Entwicklungsländer werden sie weiterhin als Hauptquelle für die Medizin verwendet (CHITME et al., 2004). Etwa 80 % der Menschen in den Entwicklungsländern verwenden traditionelle Medikamente für ihre Gesundheitsversorgung (KIM, 2005). In den letzten Jahren wurde über Polyphenole, die üblicherweise in Pflanzen gefunden werden, bezüglich vielerlei Anwendungen beim Menschen berichtet, z.B. als Antioxidant, Antiallergen, zur Fettreduktion und Krebsvorsorge (AKAZOME, 2004; CRESPI, WILLIAMSON, 2004).

Einige Studien berichteten, dass Polyphenole eine vorbeugende Wirkung gegen Karies hatten. In-vitro Studien zeigten, dass Polyphenole aus grünem Tee (KRAHWINKEL, WILLERSHAUSEN, 2000; SAKANAKA et al., 1990) oder Oolong-Tee (NAKAHARA et al., 1993; OOSHIMA et al., 1994) die Aktivität von Glucosyltransferasen und daher das Wachstum von Mutans-Streptokokken hemmten.

Es gibt zahlreiche Berichte über die Verwendung von traditionellen Pflanzenextrakten und natürlichen Produkten zur Behandlung von oralen Krankheiten (COWAN, 1999; KALEMBA, KUNICKA, 2003). Pflanzliche Mundspülungen haben daher zunehmend in der Oralprophylaxe an Wert gewonnen und dienen als Ergänzung der täglichen mechanischen Mundhygiene. Allerdings besteht weiterhin eine starke Nachfrage nach additiven und alternativen biologischen und biomimetischen Ansätzen. Ein neues Konzept ist es die Pellikel durch verschiedene Zusatzstoffe zu modifizieren, um die Zerstörung der Zahnhartsubstanz zu verringern oder zu beseitigen.

Frühere Studien belegten bereits eine Verstärkung der Schutzeigenschaft der modifizierten Pellikel auf die Zahnhartsubstanz durch Pflanzenextrakte, wie z.B. durch die wilde Form der schwarzen Johannisbeere und des Oregano (WEBER et al., 2015). In dieser Studie wurden schwarze Johannisbeere und Oreganum getestet. Nach der In-situ-Biofilmbildung und In-situ-Spülung wurden In-vitro-Tests durchgeführt, in denen die Prüfkörper in Salszsäure inkubiert wurden und photometrisch die Kalziumfreisetzung aus dem Schmelz bestimmt wurde. Im Gegensatz zu den Kontrollen sah man eine geringere Kalziumfreisetzung aus dem Schmelz und damit eine Erhöhung der Schutzfunktion der modifizierten Pellikel. Eine Modifizierung des initialen Biofilms durch verschiedene pflanzliche Extrakte könnte die Zusammensetzung des Proteoms ändern, durch mögliche Gerbung und Denaturierung der Pellikel, die Permeabilität für saure Noxen reduzieren und die Festigkeit von der Pellikel verbessern. Polyphenole, Lipide, oder Casein können in die Pellikel eingelagert werden und somit ihre protektive Wirkung verbessern (BARBOUR et al., 2008; CHEAIB, LUSSI, 2011; JOINER et al., 2003; KENSCHKE et al., 2013). Die Polyphenole können auch die Löslichkeit der adsorbierten Proteine auf der Schmelzoberfläche reduzieren, indem sie Querverbindungen zwischen den in die Pellikel integrierten Polyphenolen bilden (JOINER et al., 2006; JOINER et al., 2003). Es gibt viele medizinische Pflanzen oder Tees mit hohem Gehalt an Polyphenolen oder anderen sekundären Inhaltsstoffen, die einen potentiellen Einfluss auf die Mundhöhle (NAKATANI, 2000), somit auch auf die Zahnoberfläche haben (WEBER et al., 2015).

Aktuell liegen jedoch nur wenige wissenschaftliche Daten vor, die sich mit der Modifizierung der Pellikel beschäftigen (HANNIG, HANNIG, 2014). In dieser Studie wurden für die

Modifizierung der Pellikel die Naturextrakte Tanninsäure, Chitosan und experimentelles Hopfenextrakt untersucht.

2.4.1 Tanninsäure

Tannine (auch Tanninsäure genannt) kommen in vielen Früchten (z.B. Cranberry, Grapefruits), Pflanzen (z.B. Lotusblume, Buschklee) und Saaten (z.B. Hirse, Erbsen) vor. Tannine sind pflanzliche Gerbstoffe. Es handelt sich um natürlich vorkommende Verbindungen, die ausreichend phenolische ortho-Dihydroxygruppen enthalten. Sie erhalten durch polyphenolische Gruppen eine adstringierende Wirkung. Adstringenz leitet sich aus dem lateinischen „adstringere“ ab und bedeutet „zusammenziehen“. Die Adstringentien lösen ein pelziges/ zusammenziehendes Gefühl in der Mundhöhle aus. Dabei entsteht eine chemische Reaktion der Tanninsäure mit der Mundschleimhaut, wobei die Tanninsäure hauptsächlich zu Glykose und Gallussäure hydrolysiert.

Durch die Polyphenole können Quervernetzungen zwischen Makromolekülen, wie Proteinen, Cellulose oder Pektin, ausgebildet werden. Das Wachstum von Pilzen, Hefen, Viren und Bakterien wird durch Tannine gehemmt, welche von den Pflanzen als natürlicher Schutzmechanismus vor mikrobiellen Infektionen genutzt wird (CHUNG et al., 1998).

Zahlreiche Studien beschäftigten sich mit der Wirkung von Tanninen im menschlichen und tierischen Organismus und zeigten deren positive und medizinische Eigenschaften (AGUERRE et al., 2016; BEE et al., 2016; CHANG et al., 2017; HENKE et al., 2016). Eine antibakterielle Wirkung von polyphenolhaltigen Verbindungen konnte auf *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* und *Streptococcus salivarius* gezeigt werden (RASHEED, HAIDER, 1998).

Die Gruppe der Polyphenole ist auch in der Zahnheilkunde von großer Bedeutung. In einer Studie wurde der antikariogene Effekt von polyphenolischen Gruppen nachgewiesen (OTAKE et al., 1991). Hier wurden Ratten im Laufe der Studie mit einer kariogenen Nahrung gefüttert. In der Testgruppe waren zusätzlich Polyphenole aus grünem Tee enthalten, in der Kontrollgruppe enthielt die Nahrung keine polyphenolischen Gruppen. Die Testgruppe wies geringere Karieszahlen auf als die Kontrollgruppe. In einer weiteren Studie wurde auch beschrieben, dass Pflanzenpolyphenole, wie Epigallocatechingallat, z. B. im grünen Tee-Extrakt, die Zähigkeit und Dicke der proteinartigen Pellikelschicht verbessern und die Schutzeigenschaften der Pellikel gegen erosive Noxen erhöhen (JOINER et al., 2004; JOINER et al., 2003). Polyphenole

induzierten im Vergleich zur Kontrollpellikel in-vitro und in-situ besonders dicke und elektro-nendichte Pellikelschichten wahrscheinlich aufgrund der Denaturierung von Pellikel-Proteinen (REHAGE et al., 2017). Adstringensinduzierte ultrastrukturelle Veränderungen der Zahnpellikel können die schützenden Eigenschaften in Bezug auf die Erosion der Zähne beeinflussen (HERTEL et al., 2017; WEBER et al., 2015). Des Weiteren wurde die Reduzierung der bakteriellen Kolonisation der In-situ-Pellikel durch polyphenolhaltigen Cistustee gezeigt (HANNIG et al., 2009; HANNIG et al., 2008).

2.4.2 Chitosan

Chitosan hat eine polykationische Kohlenhydratstruktur. Sie gehört zu der Gruppe der Aminopolysaccharide, welche durch alkalische Deacetylierung aus Chitin gewonnen wird. Die Hauptchitinquelle für die Herstellung von Chitosan sind Schalen von Garnelen wie *Pandalus borealis*. Chitosan hat viele interessante Eigenschaften, einschließlich die Nicht-Toxizität und antimikrobielle Aktivität (KITUR et al., 2005). Eine Studie hat die Auswirkungen der Behandlung mit Chitosan auf die bakterielle Adhäsion und das bakterielle Wachstum untersucht (BUSCHER et al., 2008). Chitosan verursachte eine Verringerung der bakteriellen Adhäsion und war verantwortlich für die antibakterielle Wirkung. Die Wechselwirkung der positiv geladenen Aminogruppen in-vitro mit negativ geladenen mikrobiellen Zelloberflächen führt zum Verlust der Barrierefunktion der mikrobiellen Zellwand (CHUNG et al., 2004; HELANDER et al., 2001; RABEA et al., 2003) und zum Austreten von Eiweiß und anderem intrazellulären Material (DECKER et al., 2005). Die verschiedenen Chitosane unterscheiden sich im Deacetylierungsgrad. Die antimikrobiellen Wirkungen von Chitosan hängen von seinem Grad an Deacetylierung und vom Molekulargewicht ab. Je größer der Polymerisationsgrad und das Molekulargewicht sind, desto größer ist seine Fähigkeit, Proteine auszufällen (BAJEC, PICKERING, 2008). Chitosane sind auch nur im sauren pH-Wert löslich. Durch die Säure wird die Bindung an Proteine erhöht (RODRIGUEZ, 2003). In einer Studie wurde ebenfalls gezeigt, dass der Anteil an neutralen und acetylierten Einheiten in den Chitosanmolekülen einen Einfluss auf die Wahrnehmung der Adstringenz hat. Wenn der Gehalt an neutralen acetylierten Einheiten zunahm und die positive Ladungsdichte dadurch abnahm, gab es eine fortschreitende Reduktion der maximalen Adstringenz (LUCK et al., 2015).

Anwendungen der antimikrobiellen Aktivität von Chitosanen werden derzeit in Lebensmittelverpackungen, Textil- und Kosmetikindustrien sowie in der Medizin einschließlich der Zahnmedizin untersucht (COOKSEY, 2005; TSAI, SU, 1999). Die Hauptwirkung der Chitosane ist ein lipidsenkender Effekt und wird in Medizinprodukten eingesetzt (z.B. bei Lipidadsorbens (L112)) (K. RAISCH, 2005). Chitosane weisen unter anderem koagulierende, blutstillende (PORETTI et al., 2005), antibakterielle (VAN DER MEI et al., 2007) und fungizide (BHASKARA REDDY et al., 1999) Wirkungen auf. Chitosane werden hauptsächlich verwendet, um die Biokompatibilität von Oberflächen zu verbessern (HSIEH et al., 2005). Sie hemmen die Fibroblastenproliferation, stimulieren die Wanderung von polymorphkernigen Zellen und Progenitorzellen, fördern Nervenzellwachstum und Angiogenese und verbessern Knochen-, Knorpel- sowie die Hautgewebe-Bildung (BUMGARDNER et al., 2003).

In der Zahnmedizin wird Chitosan bereits in Zahnpasten eingesetzt (EWEIS et al., 2006). Die ersten Zahnpasten und Mundspülungen mit Chitosan wurden auf dem Markt bereitgestellt, z.B. Chitodent®.

Kürzlich wurden die Wirkungen von Chitosan gegen orale Bakterien untersucht (AKNCBAY et al., 2007; DECKER et al., 2005). Chitosane haben eine deutliche Tendenz, an die Speichel-Pellikel zu adsorbieren, was einen starken Einfluss auf die Oberflächeneigenschaften der Pellikel hat. Aufgrund der polykationischen Struktur der Chitosane adsorbieren sie gut an die Pellikel und erzeugen eine positiv geladene und mehr hydrophobe Pellikeloberfläche (BUSSCHER et al., 2008) (VAN DER MEI et al., 2007). Die erhöhte Hydrophobizität der Pellikel nach Chitosanadsorption erklärt die verminderte Adhäsion von *Streptococcus sobrinus* an speichelbeschichtete Schmelzoberflächen. Auch in-vivo hemmten niedermolekulare Chitosane die anfängliche Adhäsion von oralen Bakterien an humane Zahnoberflächen in einem Ausmaß, das mit der einer 50 ppm Chlorhexidinlösung vergleichbar war (SANO et al., 2001). Während einige Chitosane gegen planktonischen *Streptococcus sanguinis* inaktiv sind, zeigen andere Chitosane in Kombination mit Chlorhexidin stärkere logarithmische Reduktionen als Chlorhexidin allein (DECKER et al., 2005).

Chitosane können auf verschiedene Arten modifiziert werden, um ihre antimikrobielle Aktivität zu verstärken. Damit bieten Chitosane die Möglichkeit bestimmte Funktionen auf die Pellikeloberfläche zu übertragen (VAN DER MEI et al., 2007).

In Anbetracht der Tatsache, dass Chitosane in der Natur nicht toxische Biomoleküle sind, ist die Anwendung in der chemischen Kontrolle von Plaque durch chemisch modifizierte antimikrobielle Chitosane ein vielversprechender Forschungsansatz in der zahnmedizinischen Prophylaxe.

2.4.3 Experimentelles Hopfenextrakt

Der Hauptbestandteil dieser Lösung ist die Hopfenpflanze (*Humulus Lupulus*, Pflanzenfamilie Cannabaceae). Hopfen ist ein mehrjähriges Kraut und ist entweder männlich oder weiblich. Seine Weibchen werden ausschließlich bei der Herstellung von Bier verwendet, was zur mikrobiologischen Haltbarkeit und Schaumstabilisierung führt und vor allem als unverzichtbarer Aromaträger dient. Der Hopfen besteht aus zwei Teilen: Lupulindrüsen (*Lupuli strobulus*) und Blätter. Die Lupulindrüsen enthalten Aromastoffe, die für Bitterkeit und Aroma im Bier verantwortlich sind, während die Blätter ungenutzte Abfallprodukte sind. Die wichtigen Verbindungen für die sensorische / geschmackliche Bewertung von Bier sind α -Säuren (Humulone), die Vorläufer von Iso- α -Säuren (Isohumulone) und β -Säuren (Lupulone) sind; Humulone sind weitgehend in den Lupulindrüsen, nicht in den Blättern enthalten (TANAKA et al.). Strukturell ist Humulon ein Hydroxyphloroglucin mit drei isoprenoiden Seitenketten.

Im Europäischen Arzneibuch sind Lupulindrüsen als mildes Sedativum beschrieben.

In einer neuen Studie im Journal of Agricultural and Food Chemistry von ACS heißt es, dass sie einige Substanzen identifiziert wurden, die für gesundheitliche Auswirkungen verantwortlich sein könnten. Eine sequentielle chromatographische Technik wurde zur Trennung des Hopfenextraktes angewendet. Der Hopfenextrakt enthielt eine Fülle von hocholigomeren Proanthocyanidinen (TANAKA et al., 2014). Die Hopfenblätter enthielten eine Fülle von polyphenolischen Verbindungen (TAGASHIRA et al., 1997), (KURUMATANI et al., 2005; TANAKA et al., 2012). Außerdem wurden mehrere Bestandteile mit antibakterieller Aktivität gegen *S. mutans*, *S. salivarius* und *S. sanguis* in Hopfen gefunden (BHATTACHARYA et al., 2003).

Das Extrakt von Hopfenblättern zeigte mehrere vorteilhafte Wirkungen gegen Karies (SHINADA et al., 2007; TAGASHIRA et al., 1997). Bei der Untersuchung der antikariogenen Wirkung wurde vermutet, dass hochmolekulare Polyphenole (etwa 36 000 bis 40 000 Da) von Hopfenblättern die Zelladhärenz von kariogenen Bakterien wie z.B. *Streptococcus mutans* und *S. sobrinus* hemmten. Außerdem trat dies bei viel niedrigeren Konzentrationen auf als beim

grünen Tee oder Oolong-Tee (TAGASHIRA et al., 1997). In einer Studie wurde gezeigt, dass Hopfen als Mundspüllösung die Plaque-Bildung unterdrückt. Die Ergebnisse zeigten, dass die durchschnittliche Menge an Plaque und die Anzahl der Mutans-Streptokokken in den Plaque-Proben nach der Verwendung der Hopfen-Mundspülung signifikant geringer waren als nach der Verabreichung des Placebos (SHINADA et al., 2007). Darüber hinaus wurde in einer Untersuchung der Effekt der Antiperiodontitis berichtet (INABA et al., 2005). Polyphenole von Hopfenblättern hemmten die zelluläre PGE₂-Produktion, die durch *Porphyromonas gingivalis*, einen wichtigen Erreger der Parodontitis, induziert wurde (INABA et al., 2008), und einige bakterielle Toxine (MORINAGA et al., 2005).

Diese Ergebnisse geben eine Möglichkeit für die vorteilhafte und industrielle Nutzung der Hopfenblätter, die beim Bierbrauen nicht verwendet werden. In der Zahnmedizin wird Hopfen noch nicht verwendet.

2.5 Ziel der Studie/ Fragestellung

Der initiale Biofilm, welcher durch selektive Adsorption von Speichelproteinen auf dem Zahnschmelz gebildet wird, hat eine große Bedeutung für den Schutz der Zähne. Wie in vielen epidemiologischen Studien gezeigt, steigt die Prävalenz der Zahnerosion weiter (HANNIG et al., 2012; JAEGGI, LUSI, 2014). Der direkte Kontakt mit extrinsischen und intrinsischen Säuren ohne bakterielle Beteiligung führen zu einem langsamen Verlust vom Schmelz. Die schützende Eigenschaft der physiologischen Pellikelschicht gegen erosive Angriffe ist allerdings begrenzt und wird hauptsächlich von dem pH-Wert bestimmt. Ein möglicher präventiver Ansatz zum Schutz der Zähne ist die Pellikel durch Zusatz von verschiedenen Zusatzstoffen zu modifizieren, um die Zahnhartsubstanzzerstörung zu verringern oder zu beseitigen. Ein neues Konzept für die zahnärztliche Prophylaxe sind Naturextrakte. Pflanzliche Mundspülungen haben zunehmend in der Oralprophylaxe an Wert gewonnen und dienen als Ergänzung der täglichen mechanischen Mundhygiene. Es gibt viele medizinische Pflanzen oder Tees mit hohem Gehalt an Polyphenolen oder anderen sekundären Inhaltsstoffen, die einen potentiellen Einfluss auf die Mundhöhle (NAKATANI, 2000), somit auch auf die Zahnoberfläche haben (WEBER et al., 2015).

Eine Modifizierung des initialen Biofilms durch verschiedene pflanzliche Extrakte könnte die Zusammensetzung des Proteoms ändern, durch mögliche Gerbung und Denaturierung der Pellikel die Permeabilität für saure Noxen reduzieren und die Festigkeit von der Pellikel verbessern. Polyphenole, Lipide, oder Casein können in die Pellikel eingelagert werden und somit ihre protektive Wirkung verbessern (BARBOUR et al., 2008; CHEAIB, LUSI, 2011; JOINER et al., 2003; KENSCHKE et al., 2013). Die Polyphenole können auch die Löslichkeit der adsorbierten Proteine auf der Schmelzoberfläche reduzieren, indem sie Querverbindungen zwischen den eingebauten Polyphenolen bilden (JOINER et al., 2006; JOINER et al., 2003).

In der vorliegenden Studie wurden Tanninsäure, Chitosan und ein experimentelles Hopfenextrakt als Mundspüllösungen untersucht. Ziele dieser Studie sind zum einen den Effekt der Naturextrakte auf die Ultrastruktur der Pellikel zu überprüfen, zum anderen soll die Anwendung von wässrigen Extrakten zeigen, ob sie einen Effekt oder eine Schutzeigenschaft gegen einen erosiven Mineralverlust haben. Außerdem wurde die chemische Stabilität unter Extrembedingungen nach der Pellikelmodifizierung überprüft. Dabei wurden verschiedene Elutionsprotokolle durchgeführt.

Die Ultrastruktur der Pellikel wurde durch die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) geprüft.

Zusammengefasst befasst sich die vorliegende Studie im Detail mit den folgenden Fragen:

1. Welche morphologischen Veränderungen des In-situ-Biofilms werden mit den in dieser Studie angewendeten Naturextrakten verursacht?
2. Haben diese Naturextrakte eine Schutzfunktion auf die Schmelzoberfläche gegen saure Noxen?
3. Wie verändert sich die chemische Stabilität nach der Pellikelmodifizierung?

3 Material und Methoden

3.1 Probanden

An den klinisch experimentellen Untersuchungen haben drei gesunde Probanden im Alter zwischen 25 und 40 Jahren teilgenommen. Ausschlusskriterien für die Probanden waren die Einnahme von Medikamenten, Alkohol- und Nikotinkonsum. Erkrankungen der Speicheldrüsen oder allgemeine Leiden wurden ebenfalls anamnestisch ausgeschlossen. Es lagen keine Zeichen von Karies oder Zahnerosionen vor. Insuffiziente Restaurationen oder Entzündungen des marginalen Parodonts bestanden nicht.

Ein positives Votum der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes für die Durchführung der vorliegenden Studie lag vor dem Versuchsbeginn bereits vor (Kenn.-Nr. 238/03, 2016).

3.2 Gewinnung und Herstellung von Prüfkörper aus Zahnhartsubstanz

Frisch extrahierte Rinderfrontzähne wurden in dieser Studie zur Herstellung der Schmelzprüfkörper verwendet. Die Kronen der Rinderzähne wurden von der Wurzel an der Schmelzzementgrenze an einer Säge (Conrad Apparatebau Clausthal GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland) unter Wasserkühlung mit einer Diamant-Schneidscheibe (Schott Diamant GmbH, Oldendorf, Deutschland) abgetrennt. Aus diesen Kronen wurden rechteckige Prüfkörper (2 x 3 mm) hergestellt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in 0,1% Thymol - Lösung (Apotheke, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg, Deutschland) gelagert.

Um die Prüfkörperoberfläche zu standardisieren und um den Einfluss der Oberflächenrauheit auf die Pellikelbildung zu unterbinden, wurden die Prüfkörper mit Nassschleifpapier (Siliziumkarbid-Schleifpapier, P600-P2500, wasserdicht, Buehler, Düsseldorf, Deutschland) abnehmender Korngröße poliert. Dies erfolgte unter ständiger Wasserkühlung mit Hilfe einer Poliermaschine (Buehler, Düsseldorf, Deutschland) bis zu einer planparallelen Oberfläche. Die rechteckigen Prüfkörper bestanden zu einem Drittel aus Dentin und zu zwei Dritteln aus Schmelz. Die Schmelzseite wurde bis zur Körnung 4000 poliert, jedoch die Dentinseite nur bis zur Körnung 2500. Die Proben waren 1 mm dick. Anschließend wurde eine lichtmikroskopische Untersuchung (Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland) bei 10-facher Vergrößerung

durchgeführt, um die Oberfläche jeder Schmelzprobe zu kontrollieren. Verfärbungen, Entkalkungen oder Inhomogenitäten der Oberfläche wurden ausgeschlossen. Um alle Rückstände von dem Polierverfahren zu entfernen, wurden die fertig polierten Schmelzproben zunächst mit 3 % Natriumhypochlorit (NaOCl) (Hedinger, Stuttgart, Deutschland) für 3 min gereinigt. Als nächstes wurden die Proben mit destilliertem Wasser gewaschen, bis das NaOCl vollständig entfernt war. Danach wurden die Prüfkörper 5 min in destilliertem Wasser im Ultraschallbad (Sonorex, Typ RK31, SN 329.00104706.019, Bandelin, Berlin, Deutschland) inkubiert, 15 min in 70 % Isopropanol (Hedinger, Stuttgart, Deutschland) desinfiziert und zuletzt folgten 3 Waschschrirte mit doppelt destilliertem Wasser. In dem destillierten Wasser wurden die Präparate für die Rehydrierung bei 4 °C für maximal 3 Tage gelagert.

3.3 Herstellung von Prüfkörpertrageschienen

Für alle Probanden wurden individuelle Prüfkörpertrageschienen vorbereitet. Die Ober- und Unterkiefer der Probanden wurden mit Alginat abgeformt (Blueprint, Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Deutschland). Anschließend wurden Hartgipsmodelle hergestellt. Auf diesen wurden individuelle Schienen für den Bereich der Molaren und Prämolaren auf der linken und rechten Oberkieferseite aus Duran® konstruiert (Scheu-Dental GmbH, Iserlohn, Deutschland).

Die vorbereiteten und gereinigten Schmelzprüfkörper wurden bukkal rechts und links auf den Schienen an den Molaren mit Polyvinyl-Siloxan-Abformmaterial (President Lichtkörper, Coltene, Altstätten, Schweiz) montiert (Abb. 1). Um die montierten Schmelzproben besser zu stabilisieren, waren die Schienen mit kleinen Perforationen versehen.

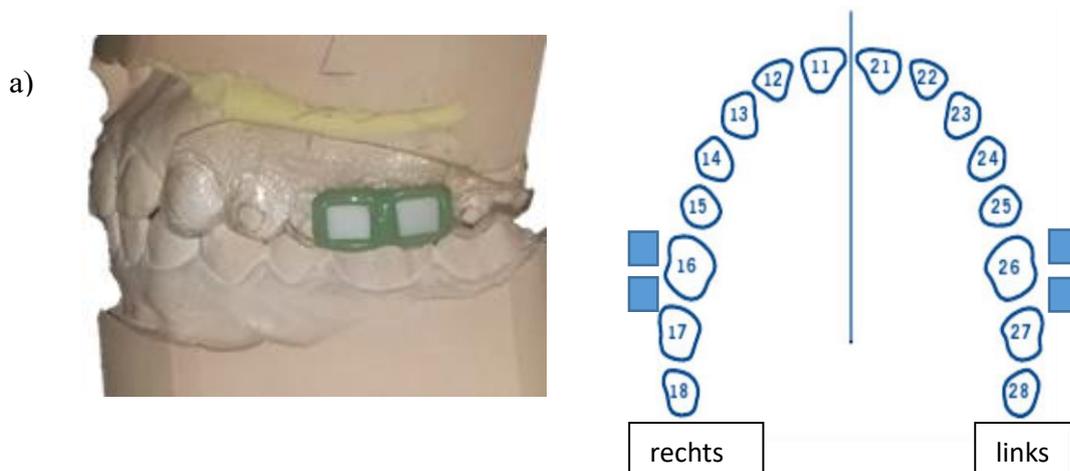


Abb. 1: zwei Prüfkörper wurden bukkal rechts und links mit Silikon an der Schiene für die intraorale Exposition befestigt:

a) Beispiel einer fertig vorbereiteten Prüfkörperschiene;

b) Tragemuster der Prüfkörper auf der Schiene

3.4 Spüllösungen

Kontroll-Versuchsreihen:

In den Kontrollexperimenten wurden mit sterilem Wasser (Aqua B. Braun, B. Braun Meisingen AG, Meisingen, Deutschland) gespült, pH-Wert (Lab 850, Schott instruments, Mainz, Deutschland) = 6,11.

Testlösungen:

Tanninsäure:

100 mg Tanninsäure (Tannic Acid, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) wurden abgewogen (Feinwaage, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) und bis zu 10 g mit sterilem Wasser aufgefüllt, Endkonzentration = 10 mg/ml, pH-Wert = 3,13.

Chitosan:

5 g Chitosan (Chitosan 95/3000, Heppe Medical Chitosan GmbH, Halle, Deutschland) wurden abgewogen, 50 ml steriles Wasser dazugegeben und 1 h auf dem Magnetprüher (IKAMAG® Ret, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland) gerührt, sodass das Pulver vollständig benetzt war. Da Chitosan nur im saurem pH-Bereich löslich ist, wurden nochmals 400 ml Wasser und 3,5 ml 100 %ige Essigsäure (Zentrales Chemikalienlager Universität Saarbrücken, Deutschland) dazugeben und weitere 3 h gerührt. Sobald die Lösung vollständig gelöst war, wurde auf 500 ml mit Wasser aufgefüllt. Vor der Verwendung wurde die Lösung nochmals mit sterilem Wasser 1:1 verdünnt. Endkonzentration = 5 mg/ml, pH-Wert = 4,50

Experimentelles Hopfenextrakt:

Wässrige Hopfenlösung (NIC Nookandeh Institute GmbH, Homburg-Saar, Deutschland)

pH-Wert = 4,70

3.5 Versuchsreihen

Die vorliegende Studie wurde als eine In-situ- / In-vitro-Studie konzipiert. Alle Probanden verwendeten alle Spüllösungen mit einer washout Phase von mindestens 48 Stunden zwischen den unterschiedlichen Experimenten. Die Versuchsreihen begannen jeweils morgens zwischen 9-10 Uhr. Die Probanden wurden angewiesen, 2 Stunden vor dem Einsetzen der Schiene, eine intensive Zahnreinigung vorzunehmen. Ab diesem Zeitpunkt war nur das Trinken von Wasser erlaubt. Während der gesamten intraoralen Verweilzeit der Schienen herrschte absolute Nahrungskarrenz. 30 min vor dem Tragen wurde nochmals eine Zahnreinigung ohne Zahnpasta vorgenommen. Die Schienen mit den montierten Proben verblieben über den Zeitraum von 3 min in der Mundhöhle und wurden anschließend für 30 s in-situ mit einer der entsprechenden Spüllösungen (10 ml) gespült.

3.5.1 Erosionsschutz

Die Veränderungen der Pellikel bzw. der Schmelzoberfläche wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde für die ultrastrukturelle Analyse der Pellikel eingesetzt. Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde unterstützend zur Transmissionselektronenmikroskopie angewandt, um erosive Veränderungen an der Schmelzoberfläche zu detektieren.

3.5.1.1 Proben für die TEM-Analysen

Nach dem Spülen wurden die Prüfkörper entweder sofort oder nach weiteren 30 min, 2 h oder 6 h intraoraler Verweilzeit aus den Mundhöhlen entnommen. Nach der oralen Exposition wurden die Proben von den Schienen entfernt und gründlich mit sterilem Wasser für 5 s (Drucksprüher, Bürkle GmbH, Bad Bellingen, Deutschland) gespült, um nicht adhärente Bakterien und Restspeichel zu entfernen. Die Prüfkörper wurden zwischen mehreren fusselfreien Tüchern (VWR Light Duty Tissue Wipers, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) kurz getrocknet. Danach wurde die Hälfte der Prüfkörper für 60 s in 1 ml Salzsäure (0,01 M) (Zentrales Chemikalienlager Universität Saarbrücken, Deutschland) in einer 24er Wellplatte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen Deutschland) auf dem Schüttler (Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, Deutschland) inkubiert und anschließend 3-mal für je 5 s in 2 ml Wasser gewaschen.

Darauffolgend wurden alle Prüfkörper für die elektronenmikroskopischen Analysen fixiert. Der prinzipielle Versuchsaufbau ist in der Abbildung 2 schematisch dargestellt.

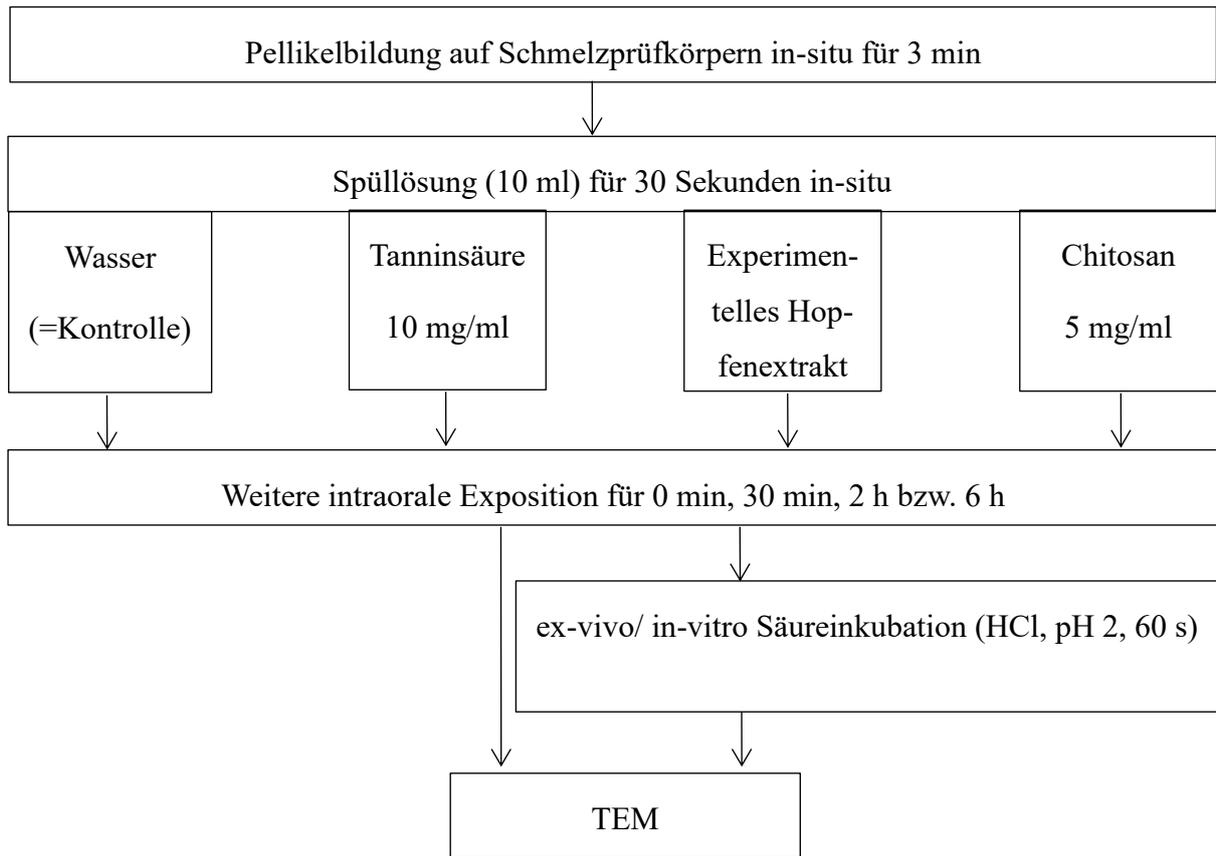


Abb. 2: Schematische Darstellung des prinzipiellen Versuchsablaufs der Versuche zur Pellikelmodifikation durch Spüllösungen mit Naturstoffen und deren Einfluss auf die Erosionsresistenz der Pellikel; transmissioelektronenmikroskopische Analysen.

3.5.1.2 Proben für die REM-Analysen

Nach dem Spülen mit einer der Spüllösungen wurden die Prüfkörper sofort oder nach 30 min, 2 h oder nach 6 h entnommen und gründlich mit Wasser gespült. Die Prüfkörper wurden dann zwischen mehreren fusselfreien Tüchern kurz getrocknet. Danach wurde ein Drittel der Prüfkörper direkt für die REM-Analysen fixiert, zwei Drittel wurde für 60 s in 1 ml Salzsäure (0,01 M) auf dem Schüttler inkubiert und anschließend 3-mal je 5 s in 2 ml Wasser gewaschen. Um das Ausmaß der Erosionen an der Schmelzoberfläche darstellen zu können, wurde die zu untersuchende Oberfläche von der Pellikel bzw. Resten der Pellikel befreit. Dazu wurde die Hälfte der geätzten Prüfkörper zunächst mit 3 % Natriumhypochlorit (NaOCl) für 3 min gereinigt. Als nächstes wurden die Proben mit destilliertem Wasser gewaschen, bis das NaOCl vollständig entfernt war. Nachfolgend wurden die Prüfkörper für 5 min in destilliertem Wasser im Ultraschallbad und 15 min in 70 % Isopropanol inkubiert. Anschließend wurden die Proben für die REM-Analysen fixiert.

Außerdem wurden Prüfkörper ohne Pellikel nach dem gleichen Vorgehen behandelt, welche als zusätzliche Kontrolle dienen. Der prinzipielle Versuchsablauf ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

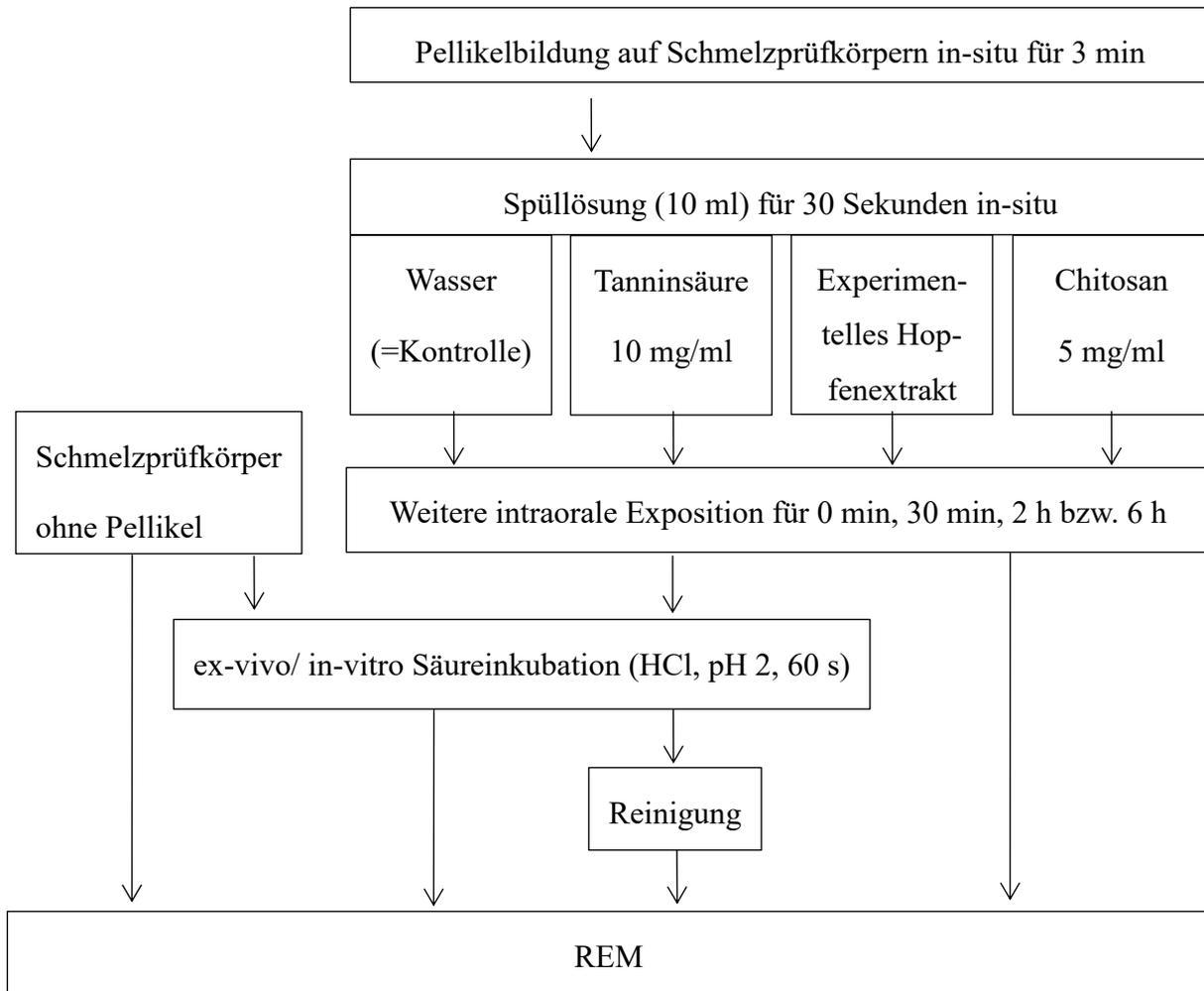


Abb. 3: Schematische Darstellung des prinzipiellen Versuchsablaufs der Versuche zur Pellikelmodifikation durch Spüllungen mit Naturstoffen und deren Einfluss auf den Erosionsschutz der modifizierten Pellikel; rasterelektronenmikroskopische Analysen.

3.5.2 Überprüfung der chemischen Stabilität der Pelikel durch Elutionsprotokolle

Die Wirksamkeit der Elution wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) überprüft.

Nach der oralen 3 min-Exposition wurden die Proben einzeln abmontiert und gründlich mit Wasser gespült. Danach wurden die Prüfkörper zwischen mehreren fusselfreien Tüchern kurz getrocknet. Der prinzipielle Versuchsablauf ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

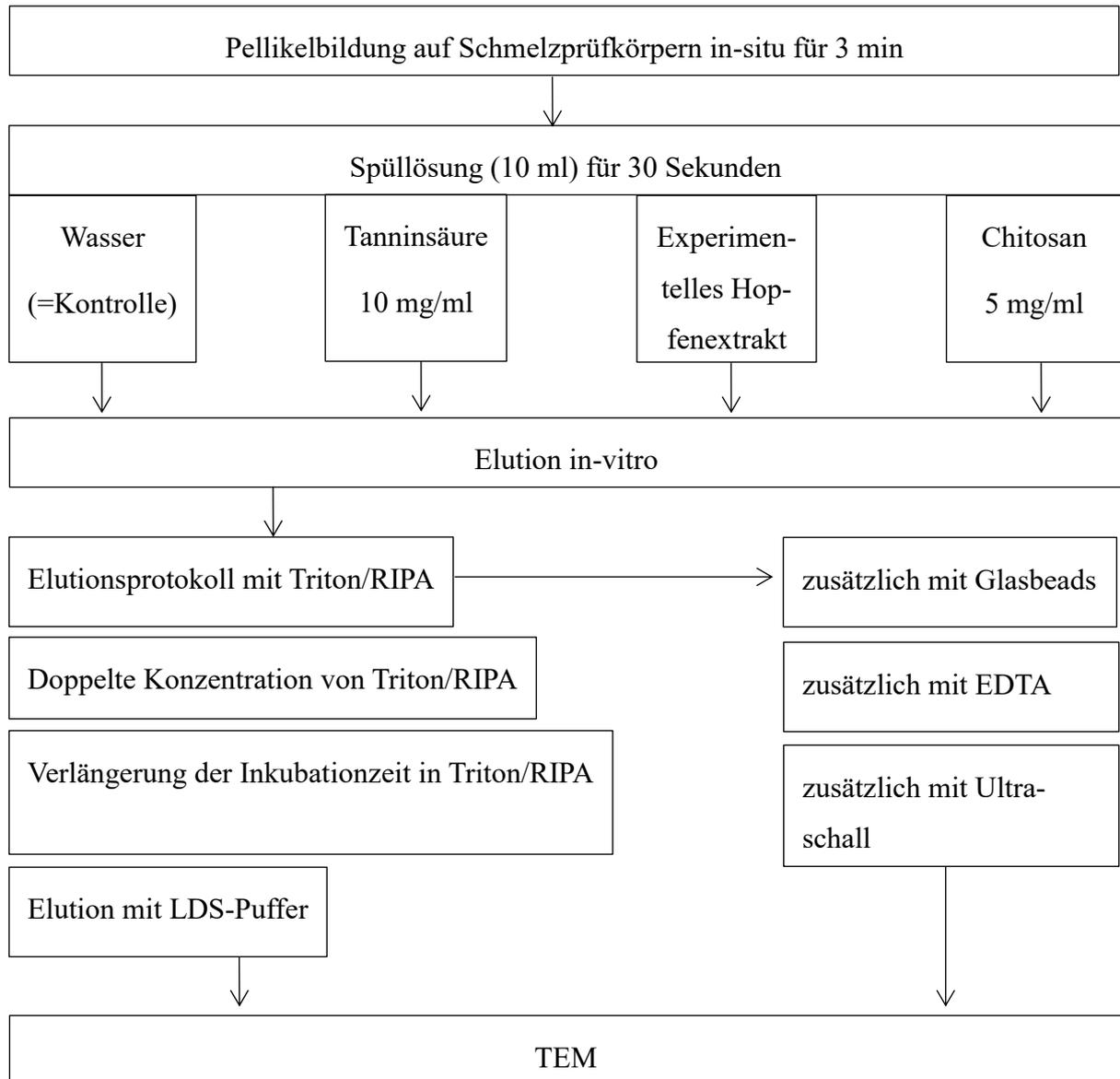


Abb. 4: Schematische Darstellung des prinzipiellen Versuchsablaufs der Versuche zur Pellikelmodifikation durch Spüllösungen mit Naturstoffen und deren chemische Stabilität der modifizierten Pellikel; transmissionselektronenmikroskopische Analysen.

3.5.2.1 Elutionsprotokoll mit Triton/RIPA

Hier wurden die getrockneten Prüfkörper einzeln und nacheinander in ein und dasselbe 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß (Safe-Lock Tubes 2,0 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit 700 µl Triton X-100-Puffer (Triton X-100 reinst., Carl Roth GmbH+Co, KG, Karlsruhe, Deutschland) gelegt, 5 s gevortext (Vortex-Gerät (Model G-560E, Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA) und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden diese erneut 5 s gevortext. Die in Triton X-100 gelegten Prüfkörper wurden nun mittels einer Kürette in ein leeres 1,5 ml Reaktionsgefäß (Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt und 5 s bei 2000 x g zentrifugiert (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland). Dieser Prüfkörper wurde nun mit einer Kürette in ein 2 ml- Reaktionsgefäß mit 700 µl RIPA-Puffer (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) überführt, 5 s gevortext und 5 min im eisgekühlten Ultraschallbad inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde nach dem Ultraschallbad erneut 5 s gevortext und der Prüfkörper wurde danach wieder in ein 1,5 ml leeres Reaktionsgefäß überführt und wie bei Triton X-100 die Schritte wiederholt (DELIUS et al., 2017; KENSCHKE et al., 2017).

3.5.2.2 Elutionprotokoll zusätzlich mit Glasbeads

Die getrocknete Prüfkörper wurden einzeln und nacheinander in ein und dasselbe 2 ml- Reaktionsgefäß mit 700 µl Triton X-100-Puffer mit zusätzlichen Glasbeads (Glasbeads, acid washed, 425-600 µm, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) gelegt, 30 min bei 4 °C gevortext. Nachfolgende Schritte wurden aus dem ersten Protokoll übernommen, nur, dass die Inkubation im RIPA-Puffer auch auf 30 min im eisgekühlten Ultraschallbad verlängert und zusätzlich Glasbeads hinzugefügt wurden.

3.5.2.3 Elutionprotokoll zusätzlich mit EDTA

Das Protokoll wurde bis zur Überführung des Prüfkörpers in den RIPA Puffer vom ersten Elutionsprotokoll übernommen. Dem RIPA-Puffer wurde zusätzlich EDTA (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) (HANNIG et al., 2005) hinzugefügt und zusammen mit dem Prüfkörper für 5 s gevortext und 60 min im eisgekühlten Ultraschallbad inkubiert. Das Reaktionsgefäß

wurde nach dem Ultraschallbad erneut 5 s gevortext. Wie bei dem ersten Elutionsprotokoll wurden die nachfolgenden Schritte wiederholt.

3.5.2.4 Elutionprotokoll zusätzlich mit Ultraschall

3.5.2.4.1 Triton/RIPA-Gemisch mit einer Ultraschallsonde

Hierfür wurden die getrocknete Prüfkörper in ein 5 ml- Reaktionsgefäß mit einem Gemisch aus 700 µl Triton X-100- und 700 µl RIPA-Puffer gelegt, 3-mal je 30 s mit direkter Ultraschallspitze (Labortechnik Fröbel GmbH, Wasserburg Bodensee, Deutschland) unter Kühlung mit Eiswasser inkubiert. Die Prüfkörper wurden nun mittels einer Kürette in ein leeres 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 s bei 2000 x g zentrifugiert.

3.5.2.4.2 Triton- bzw. RIPA-Puffer mit einer Ultraschallsonde

Die getrockneten Prüfkörper wurden in ein 2 ml- Reaktionsgefäß mit 700 µl Triton X-100-Puffer gelegt, 3-mal je 30 s mit direkter Ultraschallspitze unter Kühlung mit Eiswasser inkubiert. Die in Triton X-100 gelegten Prüfkörper wurden nun mittels einer Kürette in ein 2 ml- Reaktionsgefäß mit 700 µl RIPA-Puffer (analog Punkt 1) überführt und wieder 3-mal je 30 s mit direkter Ultraschallspitze behandelt. Der Prüfkörper wurde danach in ein 1,5 ml leeres Reaktionsgefäß überführt und 5 s bei 2000 x g zentrifugiert.

3.5.2.5 Doppelte Konzentration von Triton/RIPA

Das Protokoll entspricht dem Elutionsprotokoll des ersten Punktes, nur mit der Veränderung der Konzentrationen des Triton X-100- und des RIPA-Puffers. Es wurden die doppelten Mengen eingesetzt.

3.5.2.6 Verlängerung der Inkubationszeit in RIPA/Triton

Die getrocknete Prüfkörper wurden einzeln und nacheinander in ein und dasselbe 2 ml– Reaktionsgefäß mit 700 µl Triton X-100-Puffer gelegt, 30 bzw. 60 min bei 4 °C gevortext. Nachfolgende Schritte wurden aus dem ersten Protokoll übernommen, nur, dass die Inkubation im RIPA-Puffer auch auf 30 bzw. 60 min im eisgekühlten Ultraschallbad verlängert wurde.

3.5.2.7 Elution mit LDS-Puffer

Die Prüfkörper wurden in 50 µl 2 x NuPAGE LDS-Probenpuffer (25 µl LDS-Puffer + 10 µl Reducing agent (500 mM Dithiothreitol) + 15 µl Wasser) (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen und für 20 min bei 60 °C (ThermoMix 500, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) inkubiert und mittels einer Kürette in ein leeres 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden sie 5 s bei 2000 x g zentrifugiert.

3.6 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Wirksamkeit der chemischen Elution und der Einfluss der Erosion auf die modifizierte Pellikel durch Naturstoffe wurden im TEM geprüft. Alle Prüfkörper wurden nach den unterschiedlichen Elutionsschritten und Erosionsversuchen zur TEM-Analyse fixiert.

3.6.1 Fixierung der Proben

Die unterschiedlich behandelten Prüfkörper wurden in der 1 % igen Fixierlösung (siehe Anhang) fixiert. Die Prüfkörper konnten bis zur weiteren Präparation im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden.

Es folgten danach fünf Waschschrte (je 10 Minuten) mit Cacodylat-Puffer (0,01 M) (Carl Roth GmbH + Co, KG, Karlsruhe, Deutschland). Zur Visualisierung von organischen Strukturen wurden die Proben für 2 h in 2 % Osmiumtetroxid (500 µl) (Electron Microscopy Sciences, Pennsylvania, USA) im Dunkeln unter leichtem Schütteln nachfixiert und mit Wasser 2-mal abgespült. In dem 2. Wasser wurden die Prüfkörper 24 h bei 4 °C inkubiert (Prüfseite oben).

3.6.2 Entwässerung bis zum Araldit-Aceton-Gemisch mit 3 % Beschleuniger

Die Prüfkörper wurden danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) im geschlossenen Rollrandglas dehydriert:

- 1 x 10 min Ethanol 50 %
- 2 x 10 min Ethanol 70 %
- 2 x 10 min Ethanol 90 %
- 2 x 20 min Ethanol wasserfrei
- 2 x 20 min Aceton wasserfrei

Nach dem Entwässern wurden die Proben aus der reinen Aceton-Lösung in ein Araldit-Aceton-Gemisch (je 3,5 ml Araldite CY212 (Agarscientific, Stansted, Unite Kingdom) überführt und über Nacht bei RT im offenen Rollrandglas unter dem Abzug inkubiert. Dies gewährleistet eine vollständige Benetzung und Durchträngung der einzubettenden Strukturen. Die prinzipielle Zusammensetzung der Lösung ist in der Tabelle 1 dargestellt

3.6.3 Umsetzen in reines Araldit-Gemisch mit 2 % Beschleuniger

Am nächsten Tag wurden die Prüfkörper in das Einbettmedium überführt. Dafür wurde das Araldit-Gemisch (siehe Tabelle 1) angesetzt und in ein neues Rollrandglas gefüllt (ca. 2 ml). Die Präparate wurden dann vom 1. Glas in das 2. Glas umgesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur im offenen Rollrandglas unter einem Abzug inkubiert.

3.6.4 Umsetzen in Silikonformen mit Araldit-Gemisch mit 2 % Beschleuniger

Zettel mit einsprechenden TEM-Nummer wurden am unteren Vertiefungsrand schräg in die saubere Silikonform hinzugefügt. Die Formen wurden mit Aradit zur Hälfte befüllt, die Proben aus den Rollrandgläser herausgeholt, auf einem Vlies (Kimberly-Clark GmbH, Koblenz-Rheinhafen, Deutschland) abgetropft und in der Form positioniert. Die Formen wurden mit Araldit bis zu einer konvexen Oberflächenkrümmung aufgefüllt (ca. 0,5 ml). Unter dem Mikroskop wurden die Präparate mit einer Kanüle in die richtige Position ausgerichtet und vorhandene Blasen entfernt. Danach wurden die eingebetteten Prüfkörper bei 65 °C 48 h (Inkubator, Binder, Tuttlingen, Deutschland) auspolymerisiert. Die prinzipielle Zusammensetzung der Lösung ist in der Tabelle 1 dargestellt.

3.6.5 Herstellen der Ultradünnschnitte

Dentin wurde nach dem Einbetten an der Poliermaschine abgeschliffen und der Schmelz mit einer 1 M Salzsäure (HCl) entkalkt. Die Proben wurden dann in Araldit gegengebettet. Gegengebetteten Prüfkörper wurden an einem Ultramicrotom (Ultracut E, Bensheim, Deutschland) mit einem Diamantmesser in ultradünne Schnitte (ca. 50 nm) geschnitten. Die Ultradünnschnitte wurden dann auf Pioloform-beschichteten Kupfergittern (Plano, Wetzlar, Deutschland) montiert und mit Uranylacetat (Micro to Nano, Innovative Microscopy Supplies, Niederlande) und Bleicitrat (ChromaLys sas, Toulouse, Frankreich) kontrastiert. Die Bilder wurden unter Verwendung eines TEM TECNAI 12 Biotwin (FEI, Eindhoven, Niederlande) mit 20.000- bis 100.000-fachen Vergrößerungen aufgenommen. In jedem Ultradünnschnitt wurden die absorbierten Pellikelstrukturen auf ganzer Länge hinsichtlich ihrer Ultrastruktur analysiert und zur Dokumentation fotografiert. Die Pellikeldicke wurde repräsentativ gemessen.

Tab. 1: Araldit-Gemisch für 21 Prüfkörper:

	Araldit-Gemisch mit 3 % Beschleuniger (g)	Araldit-Gemisch mit 2 % Beschleuniger (g)
Araldit CY 212	19,5	21,84
Dodecetyl succinic anhydride (DDSA) (Agarscientific, Stansted, Unite Kingdom)	18	20,16
30 min mischen		
2,4,6- Tris(dimethylaminomethyl)phenol (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)	1,25	0,84
15 min mischen		
Aceton (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland)	Bis ca. 100 auffüllen	Bis ca. 42 auffüllen

3.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zur morphologischen Analyse der Oberflächen der Prüfkörper vor und nach der Behandlung mit Salzsäure wurde zusätzlich die Rasterelektronenmikroskopie (FEI/Philips XL30 FEG E-SEM with Electron Backscatter Diffraction analysis and Energy-Dispersive X-ray capability, FEI Corporate Headquarters, Oregon, USA) verwendet. So kann mittels rasterelektronenmikroskopischer Untersuchung die erosionsprotektive Wirkung der modifizierten Pellikel auf Schmelzoberflächen visualisiert werden. Nach einer erosiven Periode können so offene Schmelzprismen in unterschiedlicher Ausprägung dargestellt werden.

3.7.1 Fixierung der Proben

Nach der In-situ-Biofilmbildung und nach den unterschiedlichen folgenden Behandlungen der Prüfkörper wurden diese mit destilliertem sterilisiertem Wasser abgespült. Danach wurden sie für eine Stunde in einer 2 % igen Glutaraldehyd-Lösung (siehe Anhang) fixiert. Dann wurden die Prüfkörper 5-mal mit Cacodylatpuffer 0,1 M je 10 min gespült. Die Proben können im 5. Cacodylatpuffer bei 4 °C bis zu 2 Wochen gelagert werden.

3.7.2 Entwässerung und Vorbereitung der Proben

Die Prüfkörper wurden danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) entwässert:

2 x 10 min Ethanol 50 %

1 x 5 min Ethanol 70 %

1 x 5 min Ethanol 80 %

1 x 5 min Ethanol 90 %

2 x 10 min Ethanol wasserfrei

Nach dem Entwässern wurden die Proben über Nacht bei Raumtemperatur unter dem Abzug luftgetrocknet.

Mithilfe einer leitfähigen Klebefolie (Leit-Tabs, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden die entwässerten Proben auf REM-taugliche Probenhalter aus Aluminium (Specimen Stubs,

Agar Scientific Ltd, Essex, England) fixiert und mit einem Sputtercoater (Model SCD 030, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit einer dünnen, leitfähigen Kohleschicht (Kohlegarn ca.0,7 g/m, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) besputtert.

3.7.3 Untersuchung der Biofilme

Die Oberflächen der Präparate wurden systematisch mit einem Rasterelektronenmikroskop in 24-, 500-, 2000-, 5000-, 10.000- bis zu 20.000-facher Vergrößerungen untersucht und morphologische Unterschiede zwischen den verschiedenen Biofilmen registriert. Von jedem Quadranten der Prüfkörper wurden Bilder aufgenommen, die der Auswertung der Biofilmmorphologie dienten. Bei der Auswertung wurden die Säurestabilität des Schmelzes ohne Biofilm bzw. die Säurestabilitäten des Schmelzes mit unterschiedlich vorbehandelten Biofilmen miteinander verglichen.

4 Ergebnisse

4.1 Erosionsschutz

4.1.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Einblicke in die Ultrastruktur der Pellikel wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie erhalten. Repräsentative TEM-Bilder in verschiedenen Vergrößerungen (20.000- bis 100.000-fach) zeigen die Pellikel der Wasserkontrolle und die mit den verschiedenen Naturextrakten behandelte Pellikel. Die Behandlung mit natürlichen Extrakten veränderte die Ultrastruktur der Pellikel deutlich. Die Naturextrakte induzierten nach der In-situ-Exposition der Schmelzproben Erhöhungen der Pellikeldicke und Elektronendichte.

Nachfolgend sind repräsentative TEM-Aufnahmen für die verschiedenen Versuchsreihen in der 30.000-fachen Vergrößerung dargestellt. Für die Bestimmung der mittleren Dicke und der Standardabweichung wurden mindestens 10 Messungen genommen.

4.1.1.1 In-situ-Spülung mit Wasser

Wie erwartet stellte sich die Kontrollpellikel nach 3 min-Bildungszeit als eine kontinuierliche und homogene Schicht dar (Abb. 5 a). Bei der 3 min-Pellikel sieht man eine mittlere Dicke von $18,4 \pm 6,9$ nm. Bei der 30 min-Pellikel zeigt sich eine mittlere Dicke von $20,2 \pm 13,6$ nm (Abb. 5 c), nach 2 h von $100,5 \pm 29,1$ nm (Abb. 5 e) und nach 6 h von $424,8 \pm 283,8$ nm (Abb. 5 g).

Nach der Säureexposition der jeweiligen Prüfkörper war die 3 min-Pellikel nicht mehr zu sehen (Abb. 5 b). Nach 30 min- und 2 h Tragezeit war die in Säure inkubierte Pellikel weniger dicht und teilweise unterbrochen (mittlere Dicke nach 30 min: $20,7 \pm 14,5$ nm und nach 2 h: $8 \pm 2,8$ nm) (Abb. 5 d, f). Bei der 30 min-Pellikel erkennt man Infiltrationen im Schmelz. Der initiale Biofilm nach 6 h Tragezeit wird auch nach der In-vitro-Behandlung mit der Säure reduziert (mittlere Dicke nach 6 h: $101,0 \pm 87,9$ nm) (Abb. 5 h), bleibt aber als kontinuierliche, geschlossene Schicht erhalten.

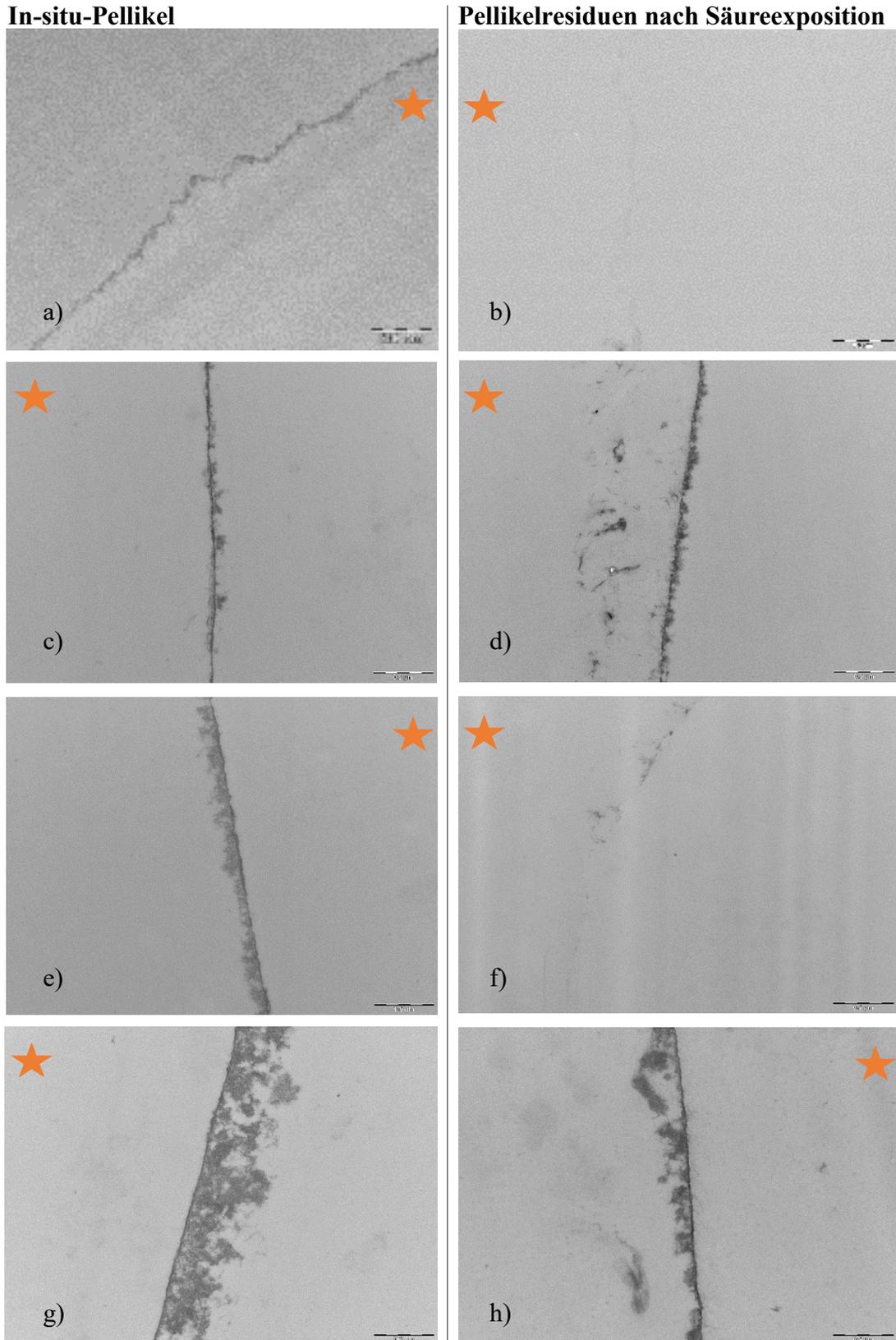


Abb. 5: TEM-Aufnahmen der Schmelzprüfkörper mit Kontrollpellikel in 30.000-facher Vergrößerung; die Prüfkörper waren unterschiedlich lang dem intraoralen Milieu ausgesetzt. (a) 3 min-Pellikel; (b) 3 min-Pellikel nach einminütiger Ätzung mit Salzsäure (pH 2) in-vitro; (c) 30 min-Pellikel; (d) 30 min-Pellikel nach einminütiger Ätzung mit Salzsäure in-vitro; (e) 2 h-Pellikel; (f) 2 h-Pellikel nach einminütiger Ätzung mit Salzsäure in-vitro; (g) 6 h-Pellikel; (h) 6 h-Pellikel nach einminütiger Ätzung mit Salzsäure in-vitro; ★ = ehemalige Schmelzseite.

4.1.1.2 In-situ-Spülung mit Tanninsäure

Die In-situ-Behandlung mit Tanninsäure induzierte im Vergleich zu den Kontrollen eine dickere Pellikelschicht. Nach 3 min und 30 min Tragezeit war die mittlere Dicke $35,0 \pm 27,3$ nm und $126,8 \pm 89,7$ nm, nach 2 h: $223,1 \pm 389,9$ nm und nach 6 h: $224,58 \pm 103,44$ nm (Abb. 6 a, c, e, g).

Die In-vitro-Exposition in Salzsäure verursachte nach den jeweiligen Tragezeiten eine Abnahme der Pellikeldicke, jedoch war die Pellikelsschicht nach der Tanninsäure Behandlung dicker als die Kontrolle. Die mittlere Pellikeldicke nach der Säureexposition lag im Falle der 3 min-Pellikel bei $8,8 \pm 3,1$ nm, im Falle der 30 min-Pellikel bei $60,2 \pm 20,1$ nm, im Falle der 2 h-Pellikel bei $122,8 \pm 31,57$ nm und im Falle der 6 h-Pellikel bei $155,35 \pm 41,13$ nm (Abb. 6 b, d, f, h).

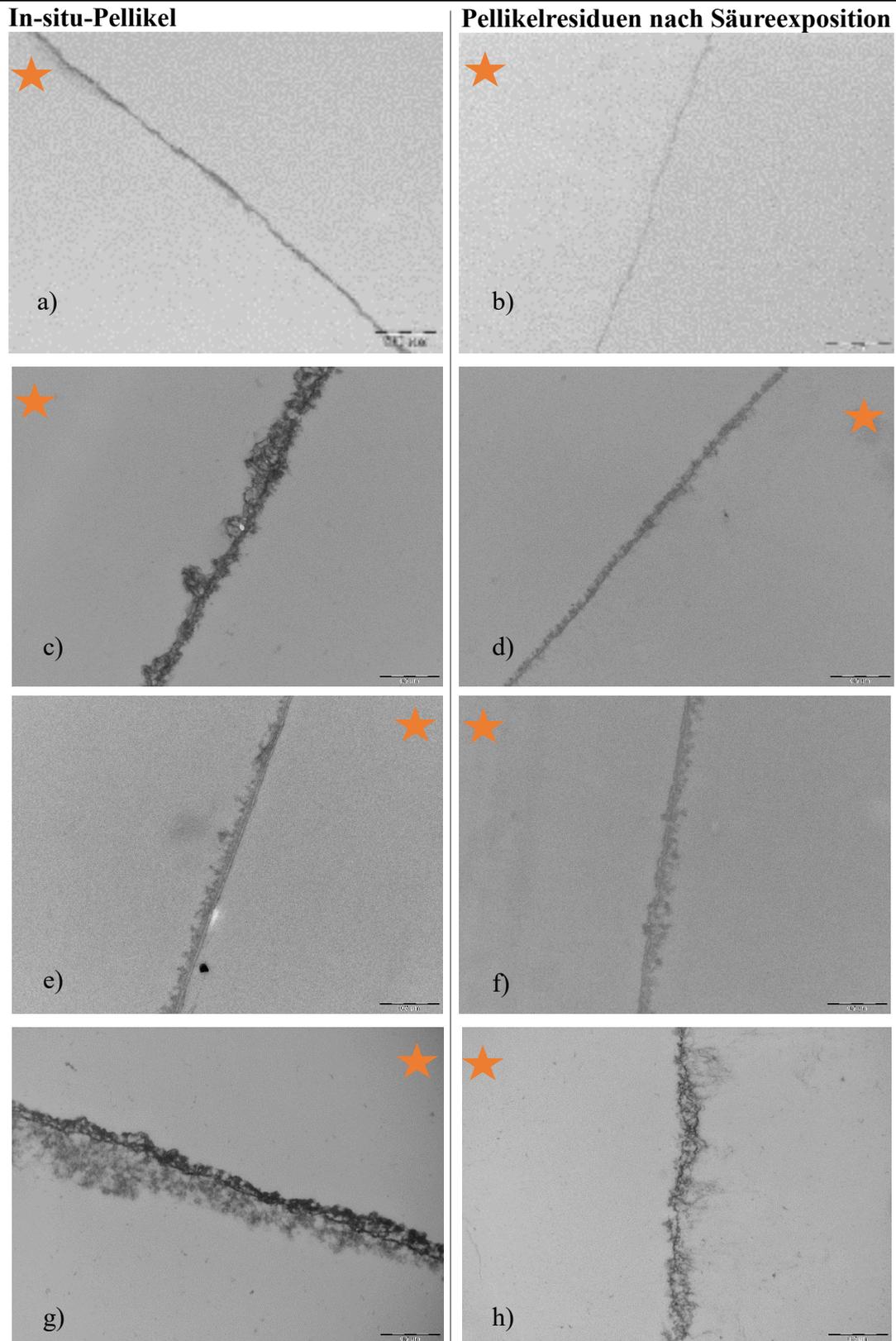


Abb. 6: TEM-Aufnahmen der mit Tanninsäure (10 mg/ml) modifizierten Pellikel in 30.000-facher Vergrößerung; die Prüfkörper waren unterschiedlich lang dem intraoralen Milieu ausgesetzt. (a) 3 min-Pellikel; (b) 3 min-Pellikel nach einminütiger Ätzung mit Salzsäure (pH 2) in-vitro; (c) 30 min-Pellikel; (d) 30 min-Pellikel nach einminütiger Ätzung mit Salzsäure in-vitro; (e) 2 h-Pellikel; (f) 2 h-Pellikel nach einminütiger Ätzung mit Salzsäure in-vitro; (g) 6 h-Pellikel; (h) 6 h-Pellikel nach einminütiger Ätzung mit Salzsäure in-vitro; ★ = ehemalige Schmelzseite.

4.1.1.3 In-situ-Spülung mit Chitosan

Im Gegensatz zur Spülung mit Tanninsäure verursachte eine In-situ-Exposition mit Chitosan eine inhomogenere Pellikelstruktur. An der Oberfläche waren elektronendichte, aggregierte Strukturen sichtbar. Die mittlere Pellikeldicke lag nach 3 min bei $24,4 \pm 7,8$ nm (Abb. 7 a). Es waren auch Infiltrationen im Schmelz zu erkennen. Nach 30 min intraoraler Exposition war die mittlere Dicke $86,5 \pm 57,1$ nm, nach 2 h: $295,6 \pm 135,8$ nm und nach 6 h: $1415,3 \pm 831,7$ nm (Abb. 7 c, e, g). Ab 30 min Tragezeit waren keine Infiltrationen zu erkennen. Die Säureinkubation induzierte bei der 3 min-Pellikel eine feine, elektronendichte basale Pellikel (mittlere Gesamtdicke: $18,3 \pm 6,3$ nm, Abb. 7 b). Proben, die 30 min in der Mundhöhle verblieben und danach in Säure inkubiert wurden, zeigten Infiltrationen im Schmelz, die mit organischem Material gefüllt waren (mittlere Gesamtdicke: $134,9 \pm 39,6$ nm, Abb. 7 d). Nach der Säureinkubtion sieht man im Falle der 2 h-Pellikel $320,9 \pm 56,9$ nm und im Falle der 6 h-Pellikel $409,5 \pm 190,13$ nm eine Abnahme der Pellikelschicht (Abb. 7 f, h).

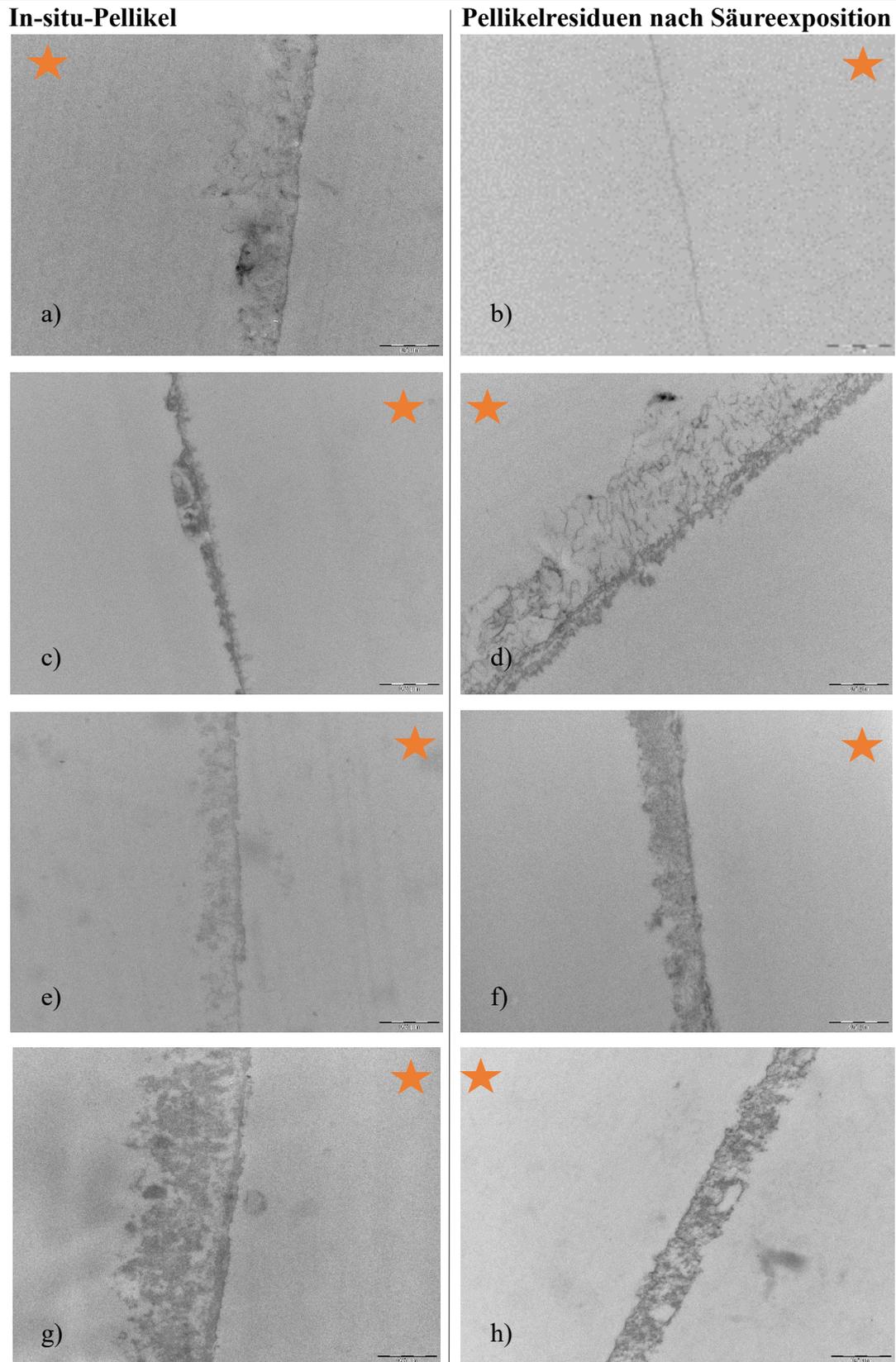


Abb. 7: TEM-Aufnahmen der mit Chitosan (5 mg/ml) modifizierten Pellikel in 30.000-facher Vergrößerung; die Prüfkörper waren unterschiedlich lang dem intraoralen Milieu ausgesetzt. (a) 3 min-Pellikel; (b) 3 min-Pellikel nach einminütiger Ätzung mit Salzsäure (pH 2) in-vitro; (c) 30 min-Pellikel; (d) 30 min-Pellikel nach einminütiger Ätzung mit Salzsäure in-vitro; (e) 2 h-Pellikel; (f) 2 h-Pellikel nach einminütiger Ätzung mit Salzsäure in-vitro; (g) 6 h-Pellikel; (h) 6 h-Pellikel nach einminütiger Ätzung mit Salzsäure in-vitro; ★ = ehemalige Schmelzseite.

4.1.1.4 In-situ-Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt

Die Behandlung der pellikelbedeckten Schmelzprüfkörper mit einem experimentellen Hopfenextrakt induzierte ebenfalls eine Zunahme der Elektronendichte. Die Ultrastruktur der Pellikel hatte ein dichtes, homogenes Aussehen (Abb. 8 a). Die 3 min-Pelikel zeigte eine mittlere Dicke von $30,8 \pm 14,9$ nm. Ähnlich der 3 min-Pelikel zeigte die 30 min-Pelikel eine Dicke von $37,2 \pm 19,3$ nm (Abb. 8 c). Nach 2 h betrug die Dicke $58,9 \pm 85,8$ nm (Abb. 8 e). Nach 6 h sieht man eine extreme Erhöhung der Pellikeldicke auf $353,5 \pm 246,5$ nm (Abb. 8 g). Trotz Säureinkubation war eine elektronendichte basale Pellikel zu sehen, die von einer dickeren homogenen Schicht bedeckt war (mittlere Gesamtdicke: $17,4 \pm 7,7$ nm im Falle der 3 min, im Falle der 30 min-Pelikel: $38,2 \pm 13,7$ nm im Falle der 2 h-Pelikel: $53,7 \pm 23,5$ nm und im Falle der 6 h-Pelikel: $124,6 \pm 6,5$ nm, Abb. 8 b, d, f, h). Im Vergleich zur Pellikeldicke vor der Säureinkubation zeigte sich nach der Säureinkubation keine Abnahme der Dicke der 3 min-, 30 min- und 2 h-Pelikel.

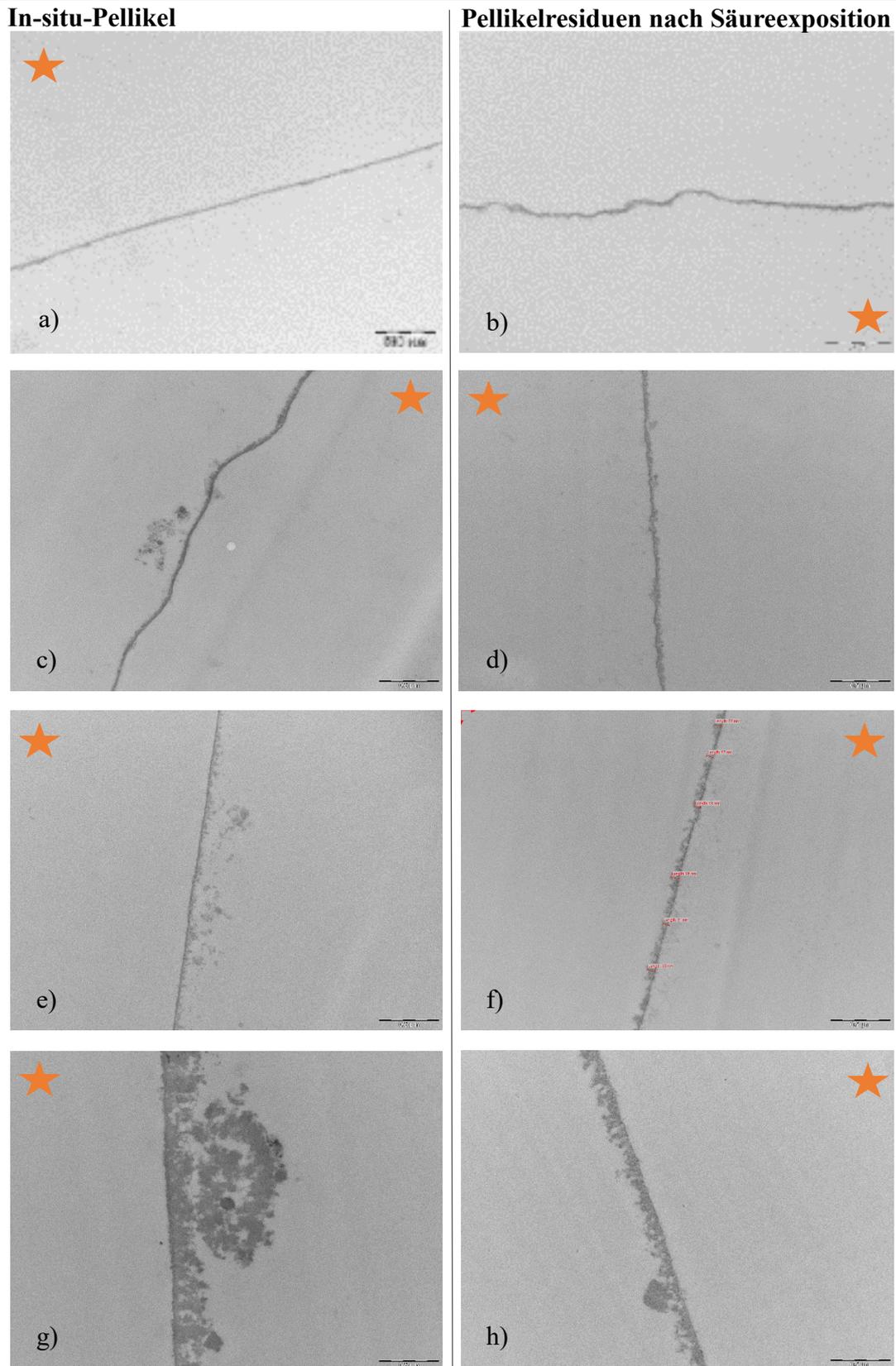


Abb. 8: TEM-Aufnahmen der mit experimentellem Hopfenextrakt modifizierten Pellicel in 30.000-facher Vergrößerung; die Prüfkörper waren unterschiedlich lang dem intraoralen Milieu ausgesetzt. (a) 3 min-Pellikel; (b) 3 min-Pellikel nach einminütiger Ätzung mit Salzsäure (pH 2) in-vitro; (c) 30 min-Pellikel; (d) 30 min-Pellikel nach einminütiger Ätzung mit Salzsäure in-vitro; (e) 2 h-Pellikel; (f) 2 h-Pellikel nach einminütiger Ätzung mit Salzsäure in-vitro; (g) 6 h-Pellikel; (h) 6 h-Pellikel nach einminütiger Ätzung mit Salzsäure in-vitro; ★ = ehemalige Schmelzseite.

In folgender Tabelle (Tab. 2) ist eine Zusammenfassung der mittleren Pellikeldicke der Proben nach unterschiedlichen Behandlungen dargestellt.

Tab. 2: Übersicht über die mittlere Pellikeldicke basierend auf den TEM-Untersuchungen

Pellikelbildungszeit		Pellikeldicke (nm) nach Spülung mit			
		Kontrolle	Tanninsäure	Experimentelles Hopfenextrakt	Chitosan
3 min	ohne/ vor Säureexposition	18,4	35,0	30,8	24,4
	nach Säureexposition	keine Pellikel erkennbar	6,0	11,5	18,3
30 min	ohne/ vor Säureexposition	20,2	126,8	37,2	86,48
	nach Säureexposition	20,7	60,2	38,2	134,9
2 h	ohne/ vor Säureexposition	100,5	223,1	58,9	295,6
	nach Säureexposition	8,0	122,8	53,7	320,9
6 h	ohne/ vor Säureexposition	424,8	224,58	353,5	1415,3
	nach Säureexposition	101,0	155,35	124,6	409,5

4.1.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Schmelzprüfkörper wurden zuerst in einer Übersichtsaufnahme mit 24-facher Vergrößerung betrachtet und danach aufsteigend mit 500-, 2000-, 5000-, 10.000- bis zu 20.000-facher Vergrößerungen untersucht. Schon in der 500-fachen Vergrößerung ist bei den meisten Prüfkörpern nach der Säureexposition eine Ätzung zu erkennen (Abb. 9 b).

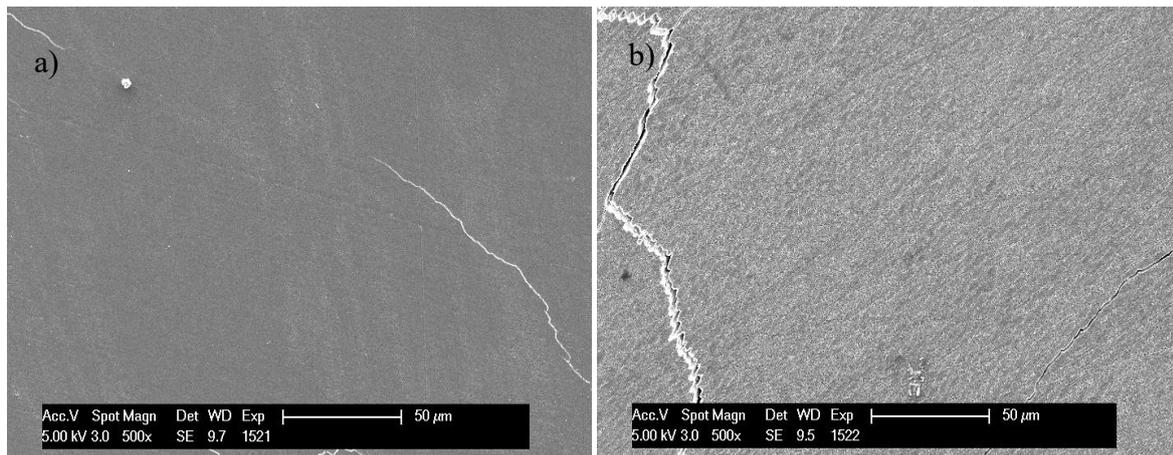


Abb. 9: REM-Aufnahmen der Kontrollpellikel mit 500-facher Vergrößerung; die Prüfkörper waren für 3 min (a) dem intraoralen Milieu ausgesetzt. Nach 3 min intraoraler Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Wasser und die Proben wurden entnommen. Die einminütige Ätzung erfolgte mit Salzsäure nach der intraoralen Exposition in-vitro (b). Hier erkennt man nach der Ätzung deutliche Demineralisationen im Schmelz.

Im folgenden Teil sind repräsentative REM-Aufnahmen für Proband 1 in der 500 und 10.000-fachen Vergrößerungen dargestellt. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in 10.000-facher Vergrößerung zeigen deutlich die Veränderungen der Schmelzoberflächen nach der Säureinkubation.

4.1.2.1 Kontrolle ohne Pellikel

Wie erwartet zeigten die Bilder von nicht pellikelbedeckten Schmelzprüfkörper ohne Ätzung eine glatte Oberfläche (Abb. 10 a). Nach 60-sekündiger Ätzung mit Salzsäure (pH-Wert von 2) sieht man eine starke Ätzung (Abb. 10 b). Es erfolgte die erosive Freilegung der Schmelzprismenstruktur. Man konnte die Zerstörung und den Verlust der prismenfremen Schmelzoberfläche beobachten. Nach der Reinigung ist die Ätzung weiterhin zu sehen (Abb. 10 c).

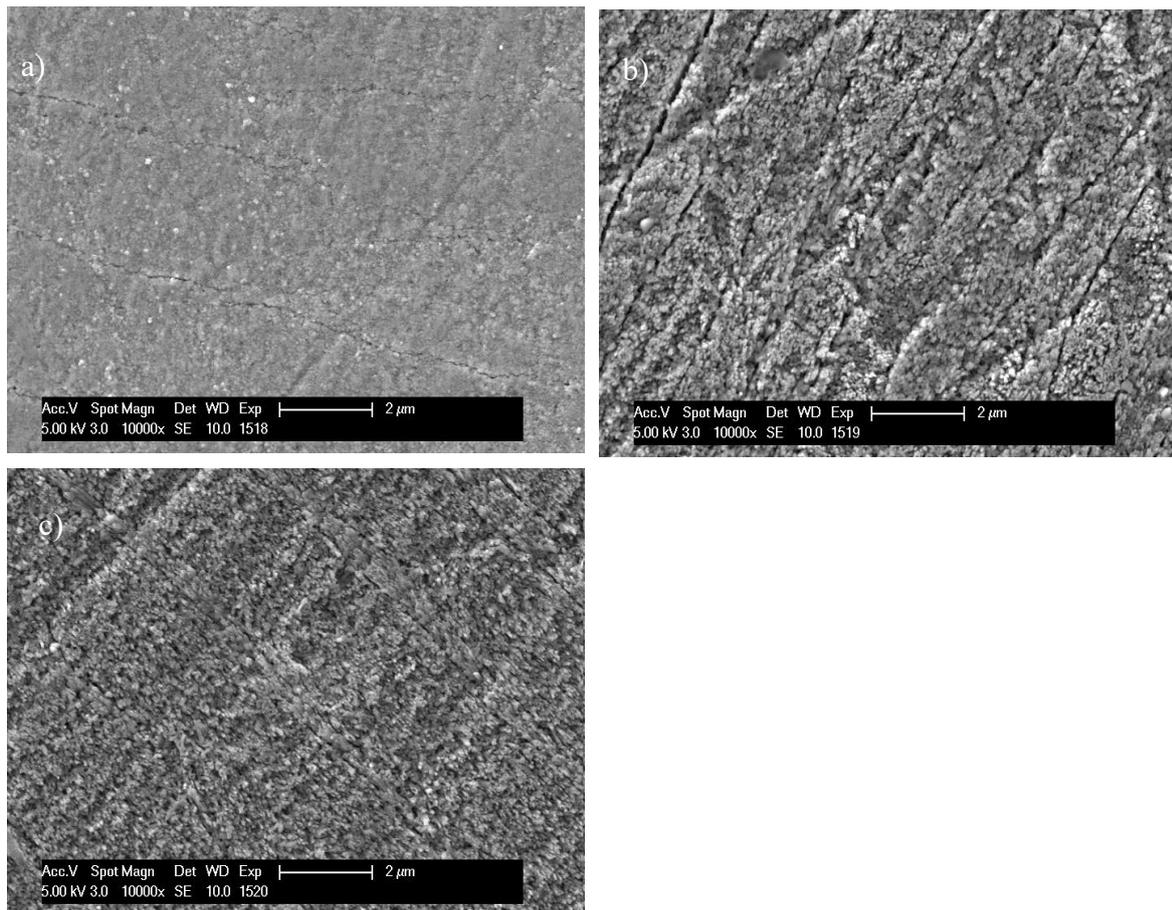


Abb. 10: REM-Aufnahmen von Kontrollschmelzprüfkörpern in 10.000-facher Vergrößerung; die Prüfkörper waren nicht dem intraoralen Milieu ausgesetzt. Bild (a) zeigt die Schmelzoberfläche nach der Politur mit Nassschleifpapier der Körnung 4000, Bild (b) erosive Veränderungen an der Schmelzprobe nach Ätzung mit Salzsäure für 60 s, Bild (c) nach Salzsäureätzung und zusätzlicher Reinigung mit NaOCl, Wasser im Ultraschallbad und Isopropanol.

4.1.2.2 In-situ-Spülung mit Wasser

Nach 3 min intraoraler Tragezeit ist die Schmelzoberfläche von einer kontinuierlichen und homogenen Pellikelschicht bedeckt (Abb. 11 a, d). Nach der Säureexposition ließ sich im Vergleich zur Kontrollprobe ohne Pellikel (Abb. 10) keine verringerte Demineralisation an der Schmelzoberfläche der pellikelbedeckten Proben feststellen (Abb. 11 b, e). Nach der Reinigung der Schmelzoberflächen stellen sich die erosiven Veränderungen noch prägnanter dar (Abb. 11 c, f). Die Schmelzoberfläche ist erosiv zerstört.

Nach 30 min, 2 h und 6 h intraoraler Tragezeit sind an der Schmelzoberfläche ohne Ätzung globuläre Partikel zu sehen (Abb. 12, 13, 14 d). Nach 30-minütiger intraoraler Exposition ist die Prüfkörperoberfläche durch die Pellikel vollständig maskiert und nach der Ätzung liegen die Prismen nicht frei (Abb. 12, 13, 14 b, e). Nach der Säureexposition der 30 min- und 2 h-Proben zeigen die Bilder nach der Reinigung strukturelle Veränderungen der Schmelzprüfkörper (Abb. 12, 13 c, f). Die Ätzung erzeugte ausgeprägte erosive Oberflächenveränderungen am Zahnschmelz bis hin zur Freilegung der Prismenstruktur. Der erosive Prozess erreichte die tieferen Schmelzschichten, wobei entweder das Zentrum oder die Peripherie der Schmelzprismen herausgelöst wurde. Das Spülen mit Wasser hat keinen rasterelektronenmikroskopisch nachweisbaren Einfluss auf die Ätzung der Schmelzoberfläche. Die Ausprägung der Ätzeffekte an der Schmelzoberfläche nahm mit steigender intraoraler Tragezeit (6 h) ab, wobei man noch deutlich die offenen Prismen erkennen kann (Abb. 14 c, f).

Vor Säureexposition

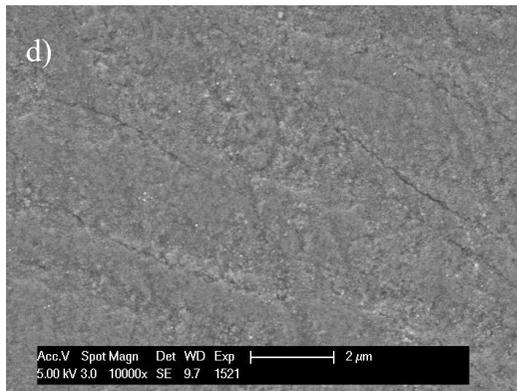
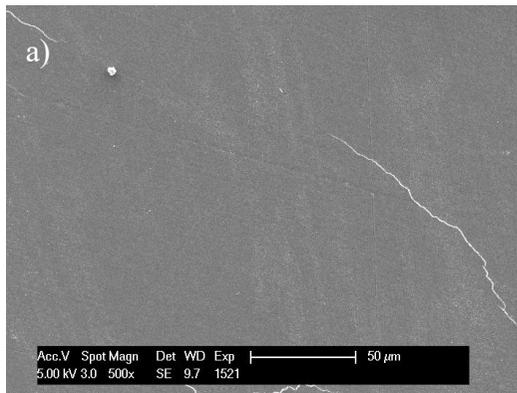
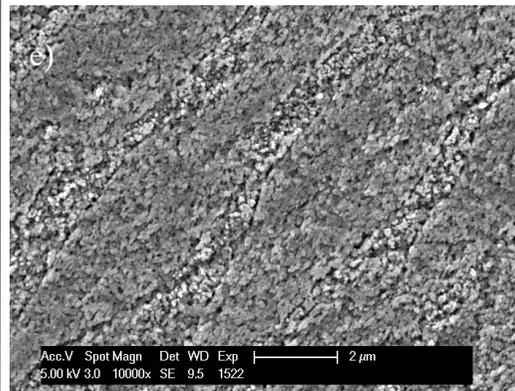
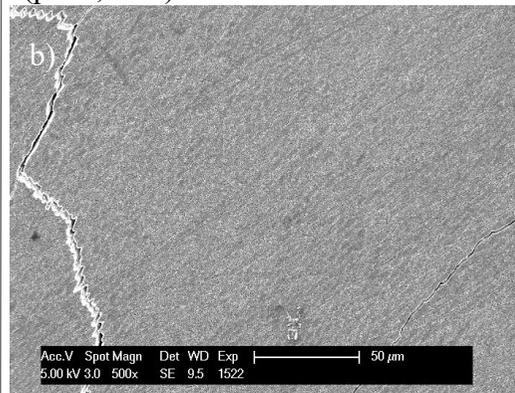
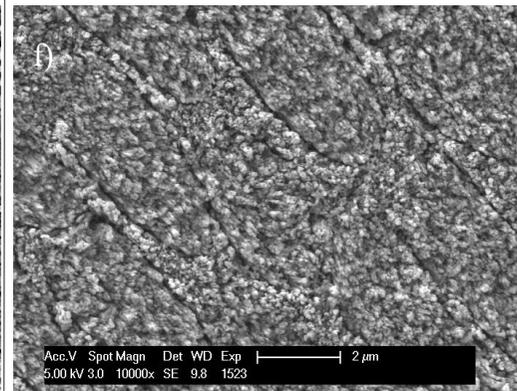
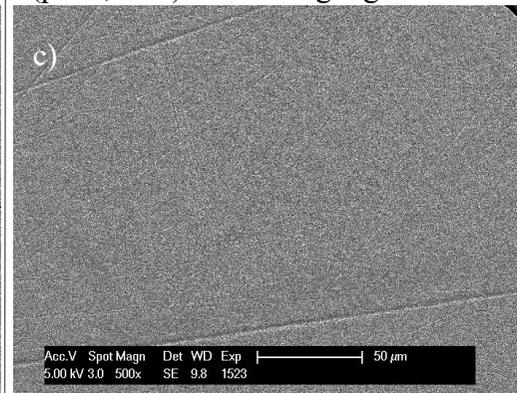
Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s)Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s) und Reinigung

Abb. 11: REM-Aufnahmen der Pellikel nach Spülung mit Wasser in 500 (a, b, c) und 10.000-facher (d, e, f) Vergrößerung. Nach 3 min intraoraler Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Wasser und die Proben wurden entnommen (a, d), zusätzliche Ätzung mit Salzsäure für 60 s zeigt erosive Veränderungen an der Schmelzprobe (b, e), nach Salzsäureätzung und zusätzlicher Reinigung mit NaOCl, Wasser im Ultraschallbad und Isopropanol sind diese erosiven Veränderungen besser erkennbar(c, f).

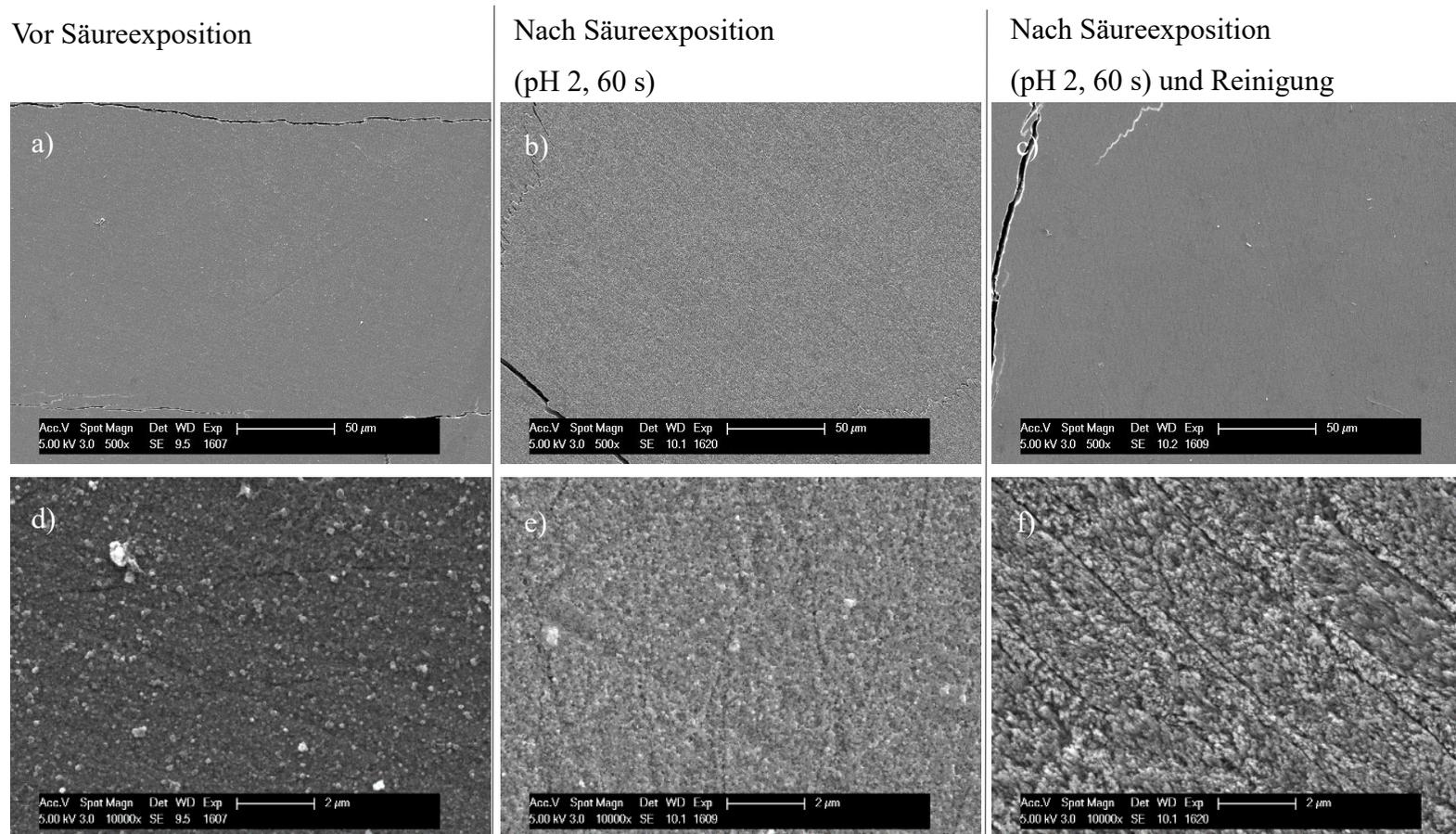


Abb. 12: REM-Aufnahmen der Pellikel und Spülung mit Wasser in 500 (a, b, c) und 10.000-facher (d, e, f) Vergrößerung. Nach 3 min intraoraler Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Wasser und die Proben wurden nach weiteren 30 min Tragezeit entnommen (a, d), zusätzliche Ätzung mit Salzsäure für 60 s zeigt erosive Veränderungen an der Schmelzprobe (b, e), nach Salzsäureätzung und zusätzlicher Reinigung mit NaOCl, Wasser im Ultraschallbad und Isopropanol sind diese erosiven Veränderungen besser erkennbar(c, f).

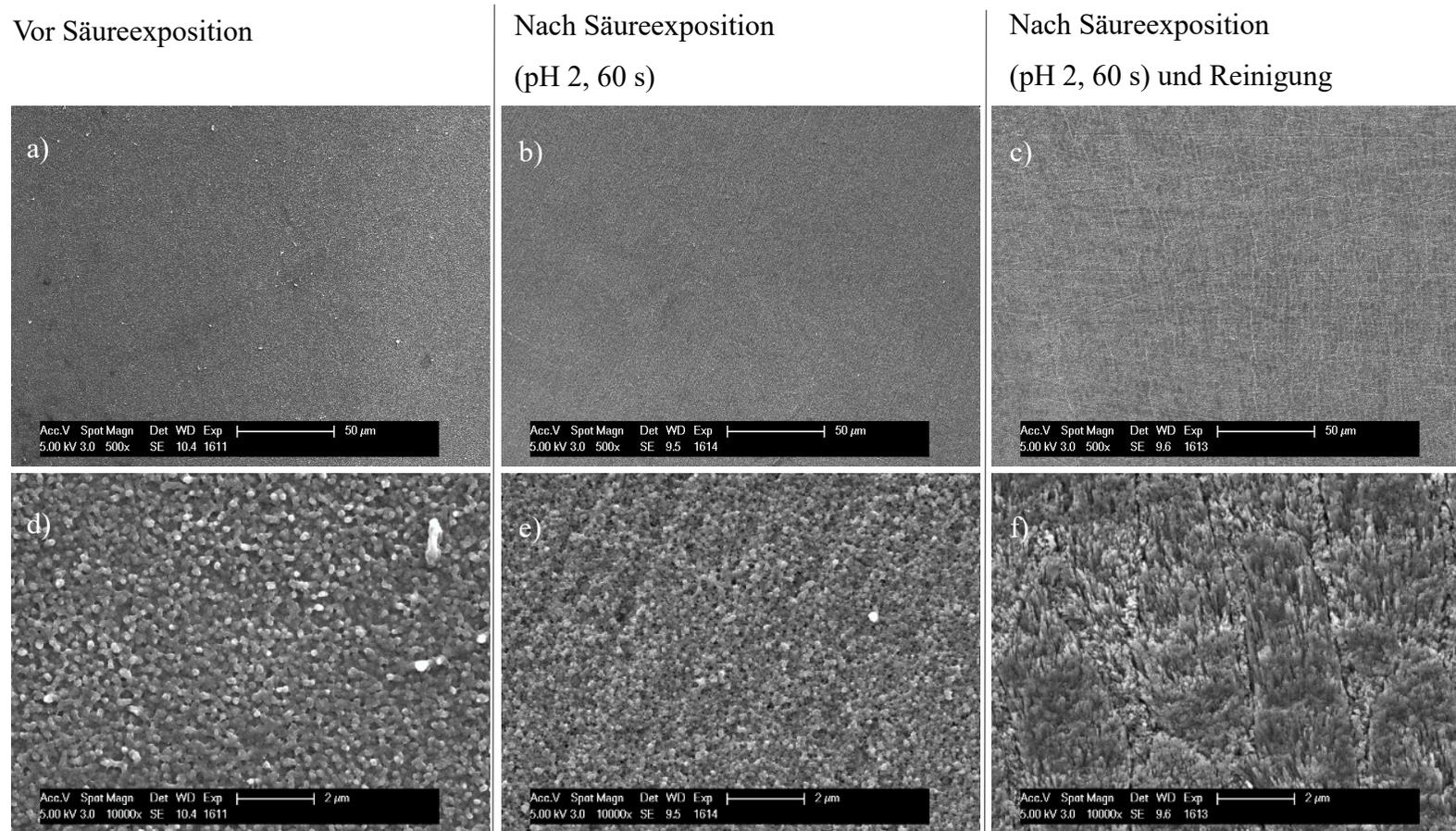
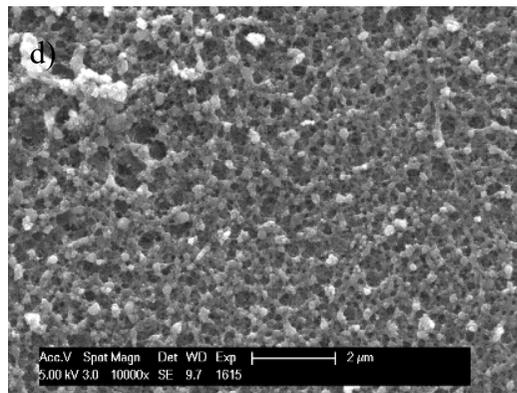
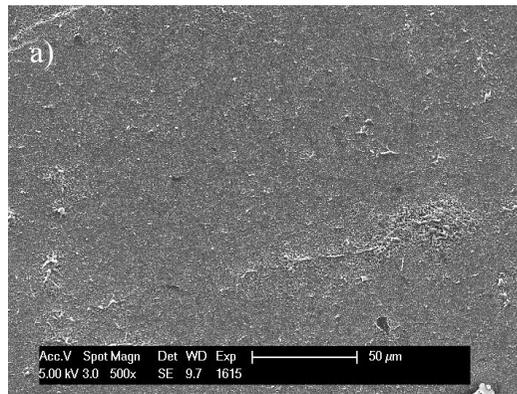
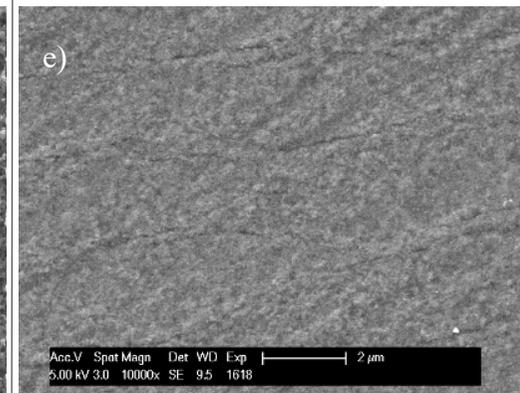
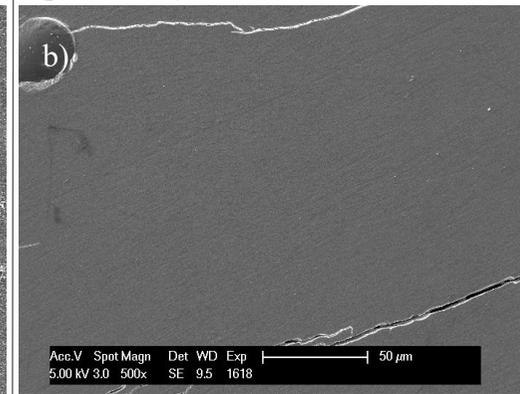


Abb. 13: REM-Aufnahmen der Pellikel und Spülung mit Wasser in 500 (a, b, c) und 10.000-facher (d, e, f) Vergrößerung. Nach 3 min intraoraler Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Wasser und die Proben wurden nach weiteren 2 h Tragezeit entnommen (a, d), zusätzliche Ätzung mit Salzsäure für 60 s zeigt erosive Veränderungen an der Schmelzprobe (b, e), nach Salzsäureätzung und zusätzlicher Reinigung mit NaOCl, Wasser im Ultraschallbad und Isopropanol sind diese erosiven Veränderungen besser erkennbar(c, f).

Vor Säureexposition



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s)



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s) und Reinigung

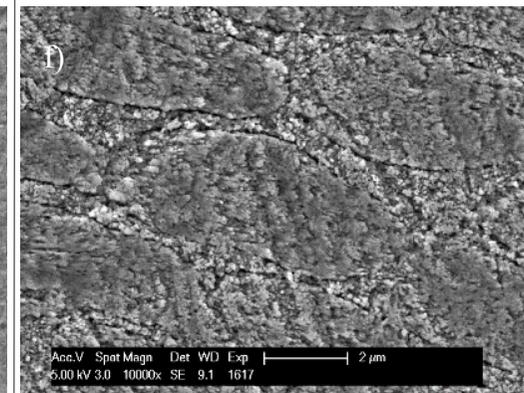
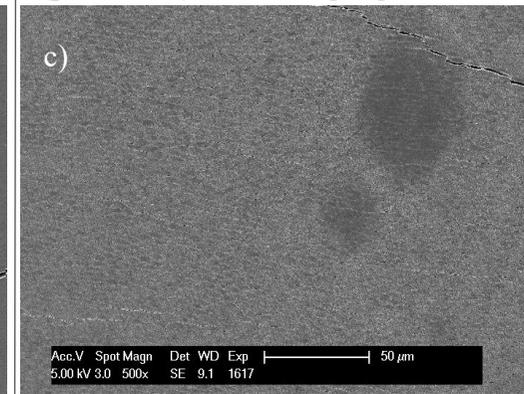


Abb. 14: REM-Aufnahmen der Pellicel und Spülung mit Wasser in 500 (a, b, c) und 10.000-facher (d, e, f) Vergrößerung. Nach 3 min intraoraler Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Wasser und die Proben wurden nach weiteren 6 h Tragezeit entnommen (a, d), zusätzliche Ätzung mit Salzsäure für 60 s zeigt erosive Veränderungen an der Schmelzprobe (b, e), nach Salzsäureätzung und zusätzlicher Reinigung mit NaOCl, Wasser im Ultraschallbad und Isopropanol sind diese erosiven Veränderungen besser erkennbar(c, f).

4.1.2.3 In-situ-Spülung mit Tanninsäure

Unmittelbar nach der In-situ-Behandlung mit Tanninsäure zeigte sich ebenfalls eine kontinuierliche und homogene Pellikelschicht auf der Schmelzoberfläche (Abb. 15 a, d). Im Vergleich zur Spülung mit Wasser (Abb. 11 a, d) sieht man nach der Ätzung eine weniger demineralisierte Oberfläche (Abb. 15 b, e). Nach der Reinigung lässt sich jedoch kein Unterschied der erosiven Veränderungen feststellen (Abb. 15 c, f). Man kann eine erosive Zerstörung der äußeren Schmelzschicht oder ein Voranschreiten des erosiven Entmineralisierungsprozesses in tiefere Areale des Schmelzes feststellen.

Auch hier sieht man nach 30 min, 2 h und 6 h intraoraler Tragezeit an der Schmelzoberfläche ohne Ätzung globuläre Partikel. Jedoch sind sie nach der Spülung mit Tanninsäure vermehrt (Abb. 16, 17, 18 a, d). Wie bei den mit Wasser gespülten Proben erkennt man, dass die äußere Schmelzschicht nach der Ätzung zum Teil erosiv zerstört ist (Abb. 16, 17, 18 b, e). Im Vergleich zur Wasserkontrolle beobachtet man auch nach der Reinigung der Proben im Falle der 30 min, 2 h und 6 h Tragezeit die erosive Freilegung der Schmelzprismenstruktur, wobei entweder das Zentrum oder die Peripherie der Schmelzprismen herausgelöst wurden (Abb. 16, 17, 18 c, f).

Vor Säureexposition

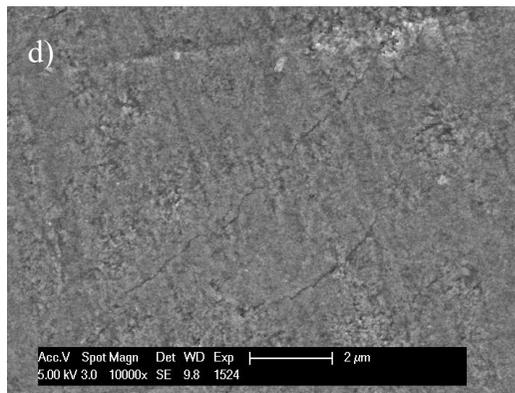
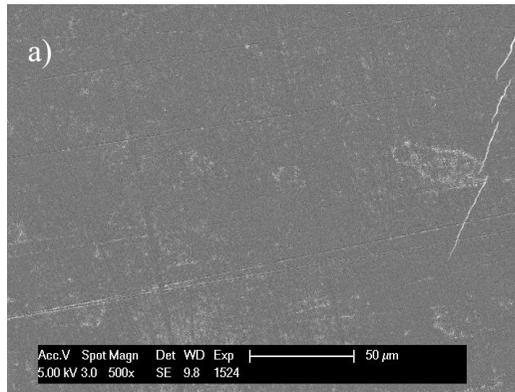
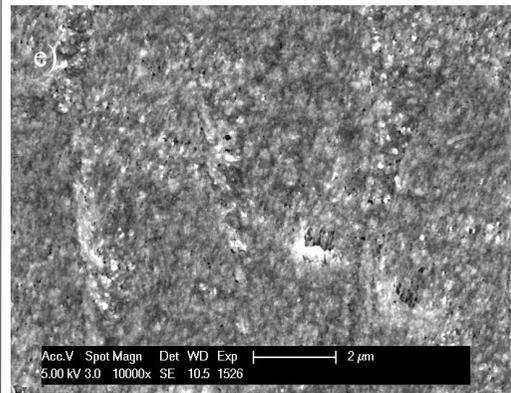
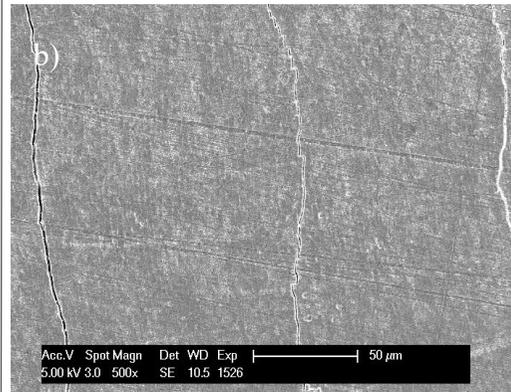
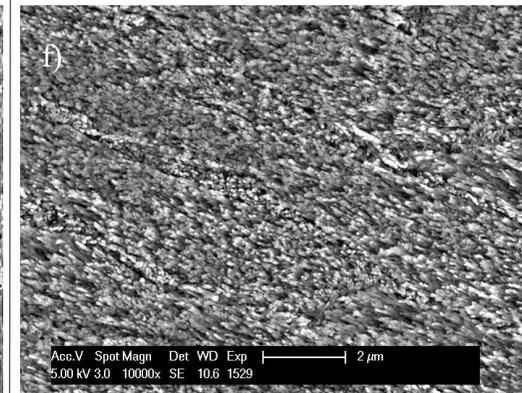
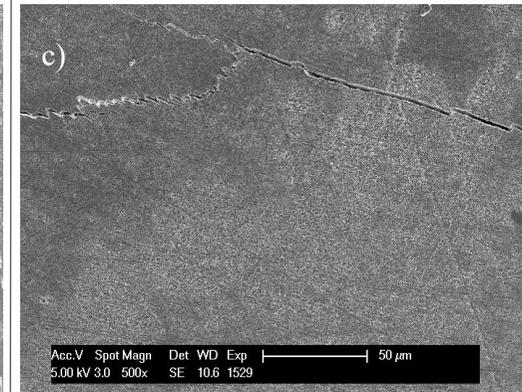
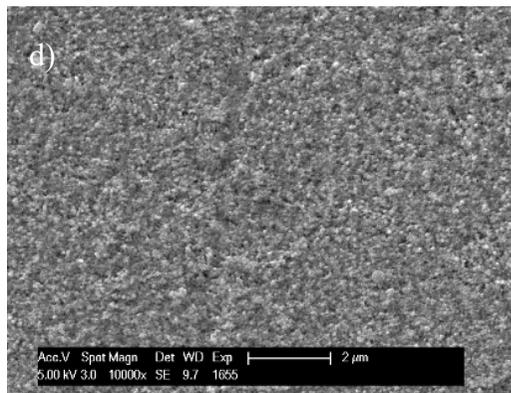
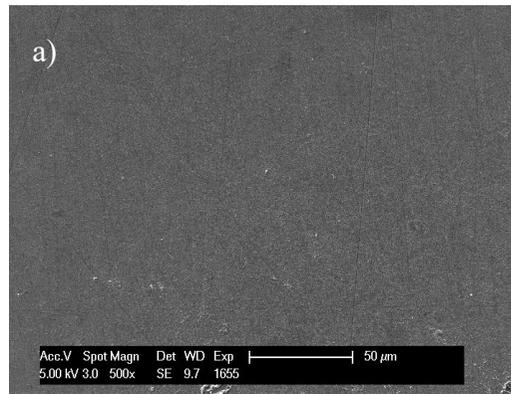
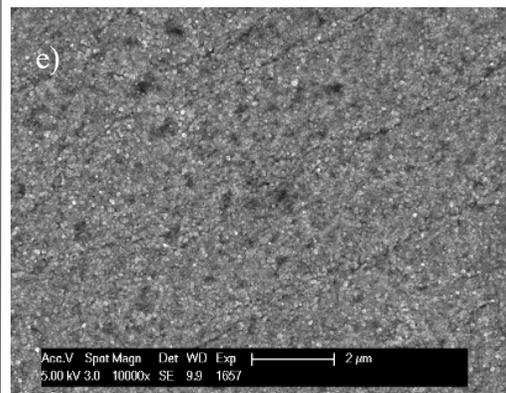
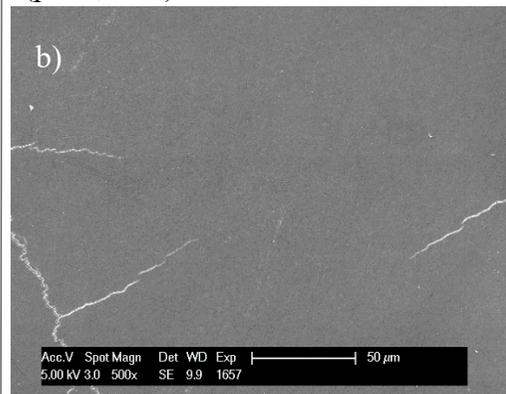
Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s)Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s) und Reinigung

Abb. 15: REM-Aufnahmen der mit Tanninsäure (10 mg/ml) modifizierten Pellicel in 500 (a, b, c) und 10.000-facher (d, e, f). Nach 3 min intraoraler Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Tanninsäure (10 mg/ml) und die Proben wurden entnommen (a, d), zusätzliche Ätzung mit Salzsäure für 60 s zeigt erosive Veränderungen an der Schmelzprobe (b, e), nach Salzsäureätzung und zusätzlicher Reinigung mit NaOCl, Wasser im Ultraschallbad und Isopropanol sind diese erosiven Veränderungen besser erkennbar(c, f).

Vor Säureexposition



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s)



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s) und Reinigung

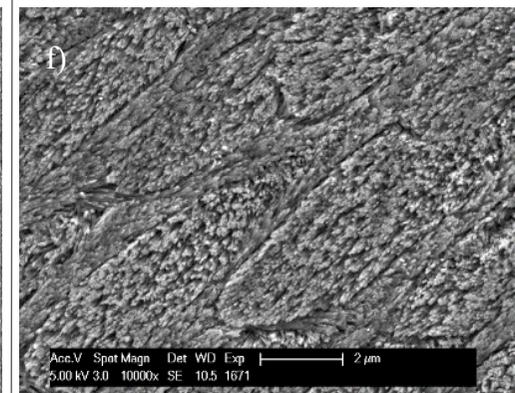
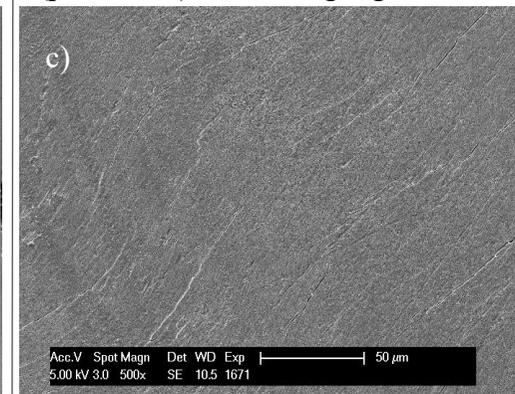
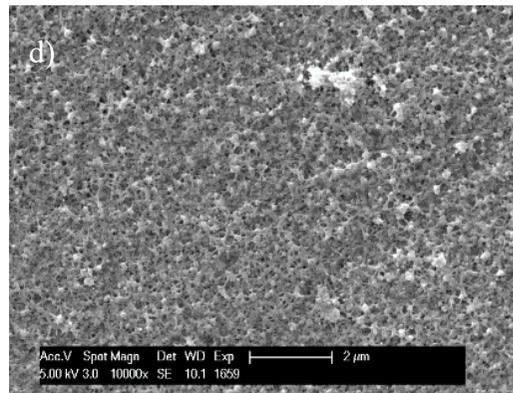
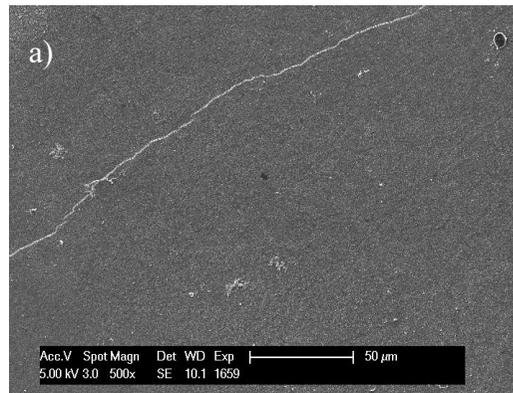
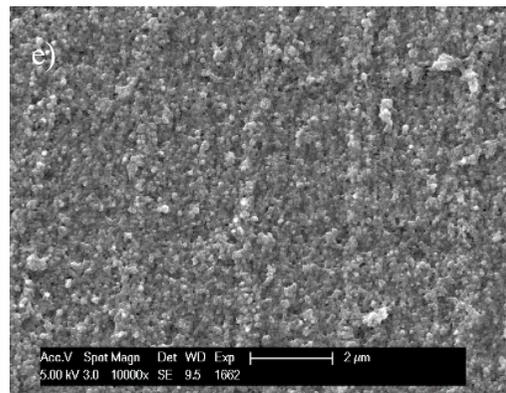
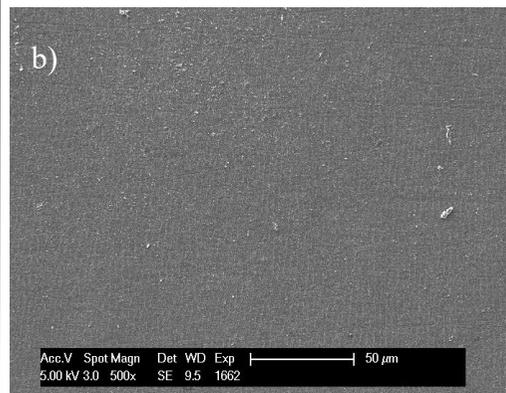


Abb. 16: REM-Aufnahmen der mit Tanninsäure (10 mg/ml) modifizierten Pellikel 500 (a, b, c) und 10.000-facher (d, e, f) Vergrößerung. Nach 3 min intraoralen Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Tanninsäure (10 mg/ml) und die Proben wurden nach weiteren 30 min Tragezeit entnommen (a, d), zusätzliche Ätzung mit Salzsäure für 60 s zeigt erosive Veränderungen an der Schmelzprobe (b, e), nach Salzsäureätzung und zusätzlicher Reinigung mit NaOCl, Wasser im Ultraschallbad und Isopropanol sind diese erosiven Veränderungen besser erkennbar(c, f).

Vor Säureexposition



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s)



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s) und Reinigung

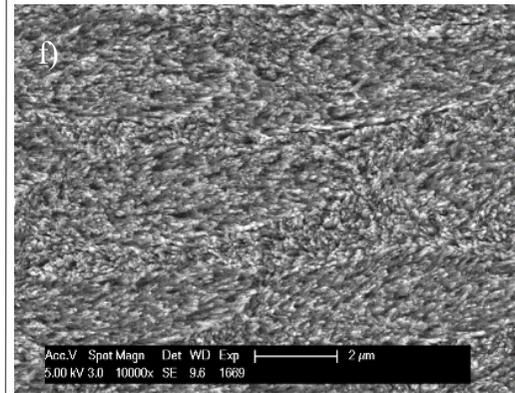
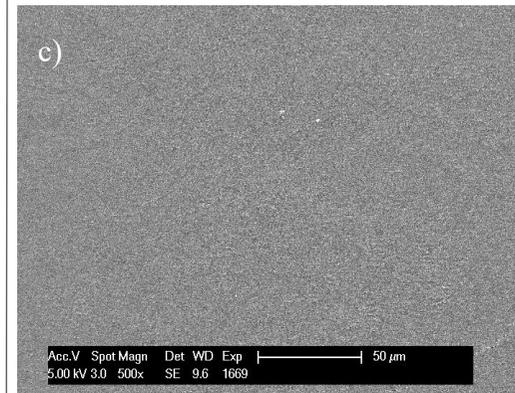
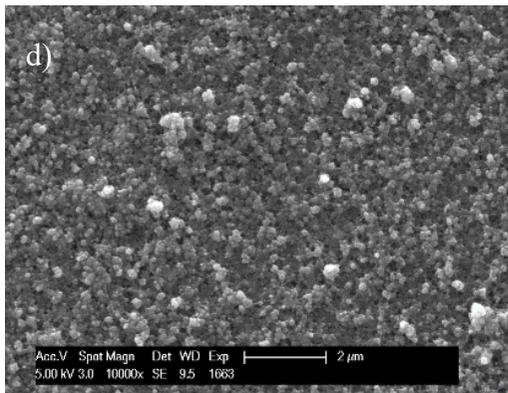
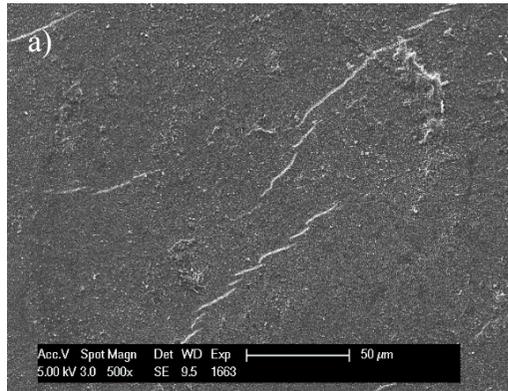
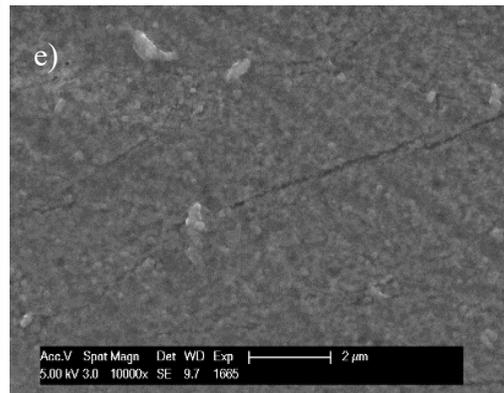
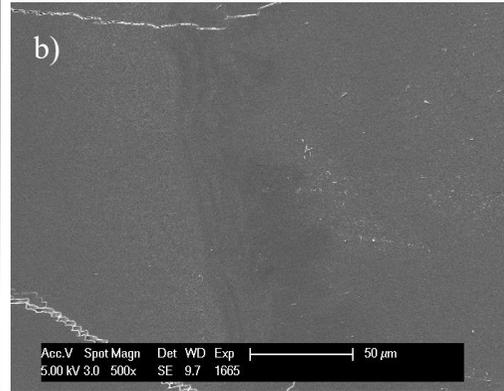


Abb. 17: REM-Aufnahmen der mit Tanninsäure (10 mg/ml) modifizierten Pellicel in 500 (a, b, c) und 10.000-facher (d, e, f) Vergrößerung. Nach 3 min intraoralen Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Tanninsäure (10 mg/ml) und die Proben wurden nach weiteren 2 h Tragezeit entnommen (a, d), zusätzliche Ätzung mit Salzsäure für 60 s zeigt erosive Veränderungen an der Schmelzprobe (b, e), nach Salzsäureätzung und zusätzlicher Reinigung mit NaOCl, Wasser im Ultraschallbad und Isopropanol sind diese erosiven Veränderungen besser erkennbar(c, f).

Vor Säureexposition



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s)



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s) und Reinigung

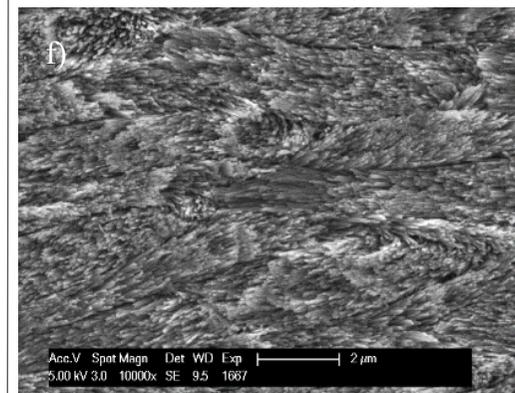
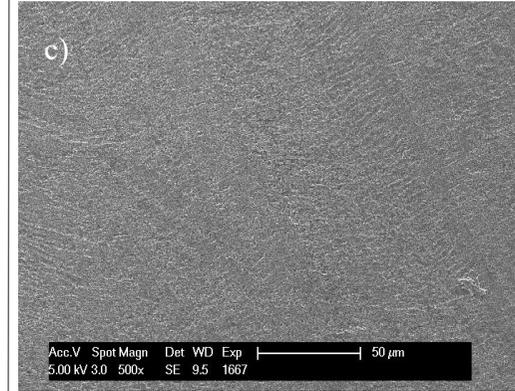


Abb. 18: REM-Aufnahmen der mit Tanninsäure (10 mg/ml) modifizierten Pellikel in 500 (a, b, c) und 10.000-facher (d, e, f) Vergrößerung. Nach 3 min intraoraler Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Tanninsäure (10 mg/ml) und die Proben wurden nach weiteren 6 h Tragezeit entnommen (a, d), zusätzliche Ätzung mit Salzsäure für 60 s zeigt erosive Veränderungen an der Schmelzprobe (b, e), nach Salzsäureätzung und zusätzlicher Reinigung mit NaOCl, Wasser im Ultraschallbad und Isopropanol sind diese erosiven Veränderungen besser erkennbar(c, f).

4.1.2.4 In-situ-Spülung mit Chitosan

Insbesondere die In-situ-Behandlung mit Chitosan verursachte ein dichtes, homogenes Aussehen der Pellikeloberfläche (Abb. 19 a, d). Man sieht an der Schmelzoberfläche nach 30 min und 2 h vereinzelte Partikel (Abb. 20, 21 a, d). Nach 6 h Tragezeit erkennt man vermehrte Partikel (Abb. 22 a, d). Die Säureinkubation verursachte nach 2- und 6- stündiger Pellikelbildungszeit mikromorphologische Veränderungen am Zahnschmelz (Abb. 21, 22 b, e). Nach der Reinigung erkennt man jedoch im Vergleich zur Wasserkontrolle bei der 3 min-Pellikel keinen Unterschied (Abb. 19 c, f). Nach 30-minütiger intraoraler Tragezeit waren initiale oberflächliche Entmineralisierungen, die sich in Form von Mikrorauigkeiten auf der Schmelzoberfläche darstellen, zu beobachten (Abb. 20 c, f). Nach 2- und 6- stündiger Pellikelbildungszeit nahm die Ausprägung dieser minimalen Ätzeffekte nicht zu. Das Ausmaß dieser erosiven Veränderungen ist deutlich geringer ausgeprägt als die säureinduzierte Demineralisierung des Schmelzes im Falle der Wasserkontrolle. Eine erosive Destruktion der äußeren Schmelzschicht oder ein Voranschreiten des Entmineralisierungsprozesses in tiefere Areale des Schmelzes konnte rasterelektronenmikroskopisch nicht festgestellt werden. Man kann die von der Politur herrührenden Schleifspuren auf dem Schmelz identifizieren (Abb. 21, 22 c, f).

Vor Säureexposition

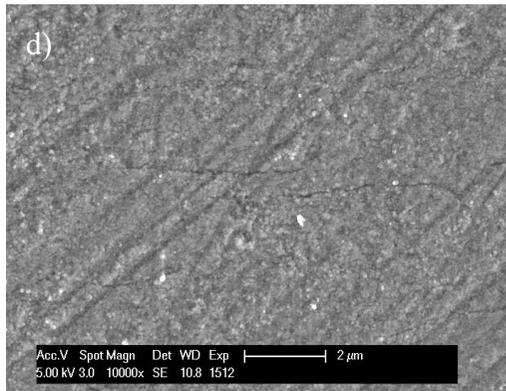
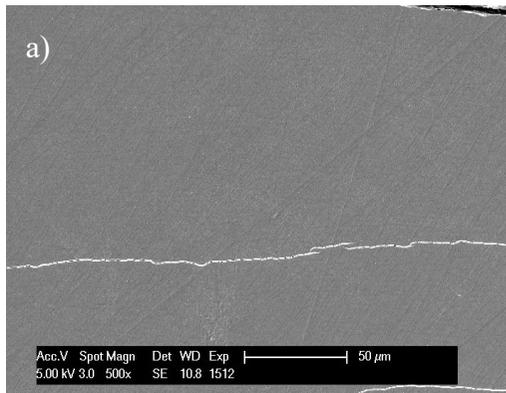
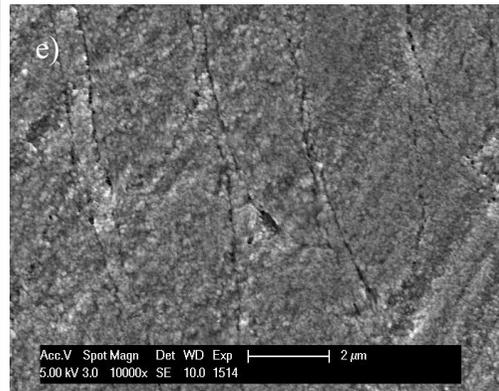
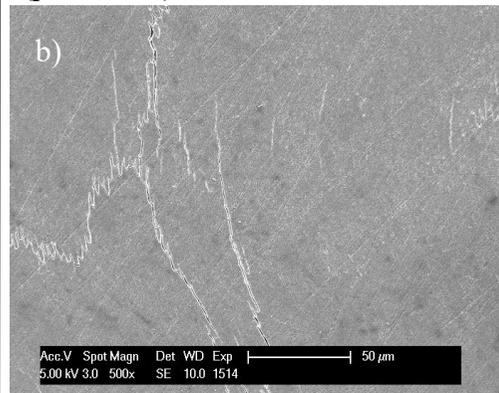
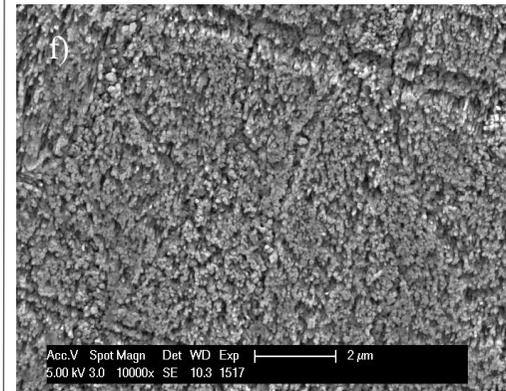
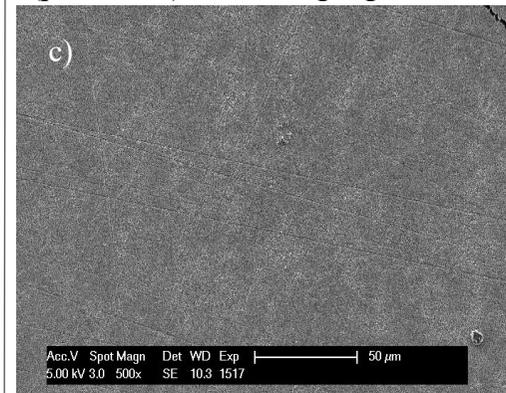
Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s)Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s) und Reinigung

Abb. 19: REM-Aufnahmen der mit Chitosan (5 mg/ml) modifizierten Pellet in 500 (a, b, c) und 10.000-facher (d, e, f) Vergrößerung. Nach 3 min intraoralen Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Chitosan (5 mg/ml) und die Proben wurden nach 3 min Tragezeit entnommen (a, d), zusätzliche Ätzung mit Salzsäure für 60 s zeigt erosive Veränderungen an der Schmelzprobe (b, e), nach Salzsäureätzung und zusätzlicher Reinigung mit NaOCl, Wasser im Ultraschallbad und Isopropanol sind diese erosiven Veränderungen besser erkennbar(c, f).

Vor Säureexposition

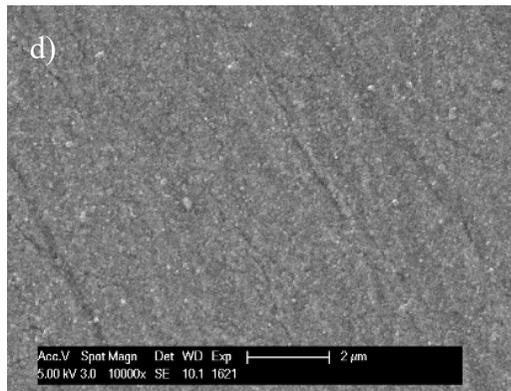
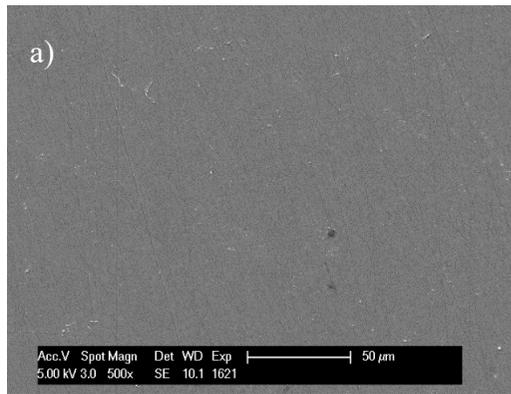
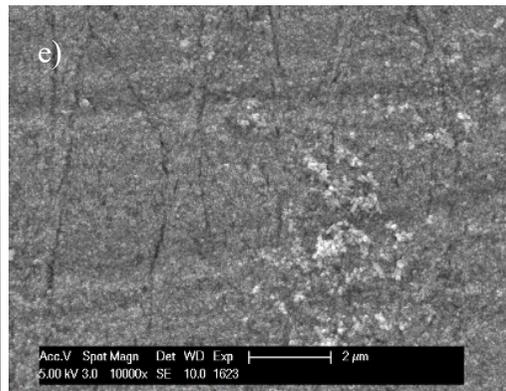
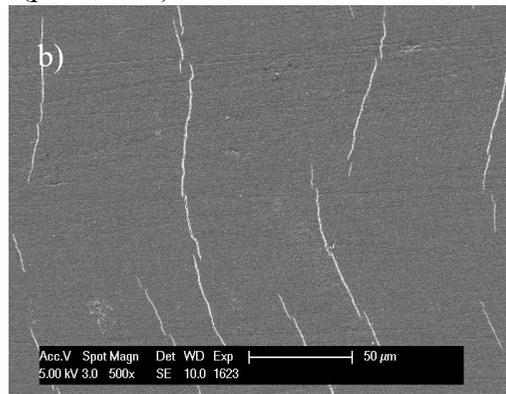
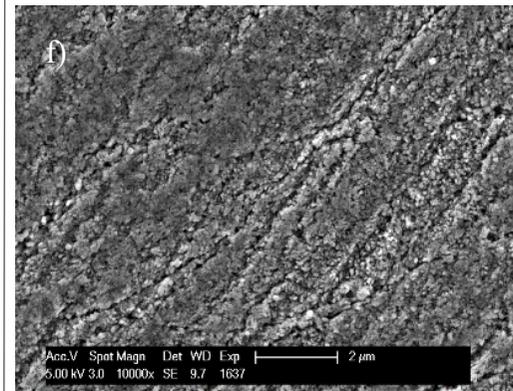
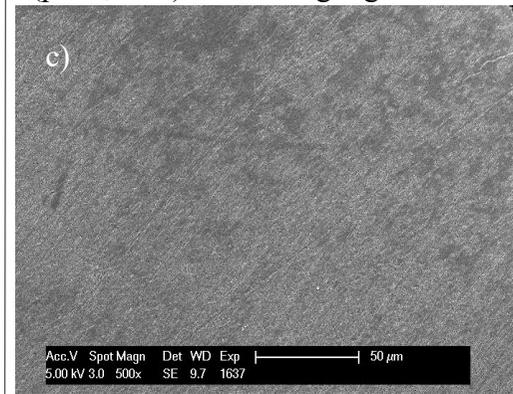
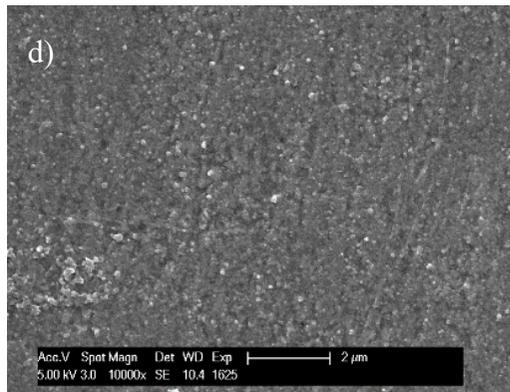
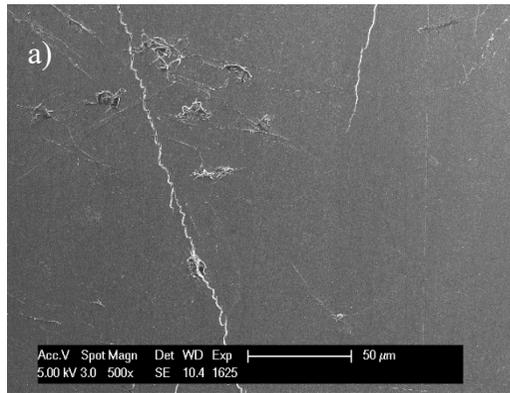
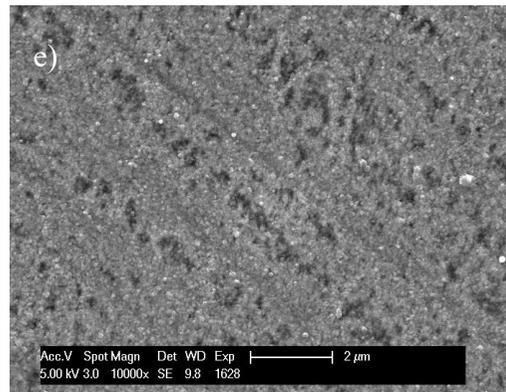
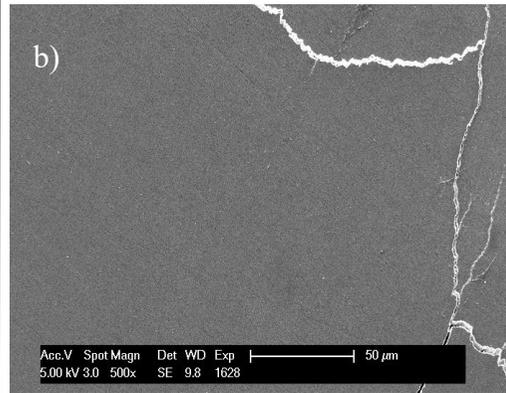
Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s)Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s) und Reinigung

Abb. 20: REM-Aufnahmen der mit Chitosan (5 mg/ml) modifizierten Pellet in 500 (a, b, c) und 10.000-facher (d, e, f) Vergrößerung. Nach 3 min intraoraler Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Chitosan (5 mg/ml) und die Proben wurden nach weiteren 30 min Tragezeit entnommen (a, d), zusätzliche Ätzung mit Salzsäure für 60 s zeigt erosive Veränderungen an der Schmelzprobe (b, e), nach Salzsäureätzung und zusätzlicher Reinigung mit NaOCl, Wasser im Ultraschallbad und Isopropanol sind diese erosiven Veränderungen besser erkennbar(c, f).

Vor Säureexposition



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s)



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s) und Reinigung

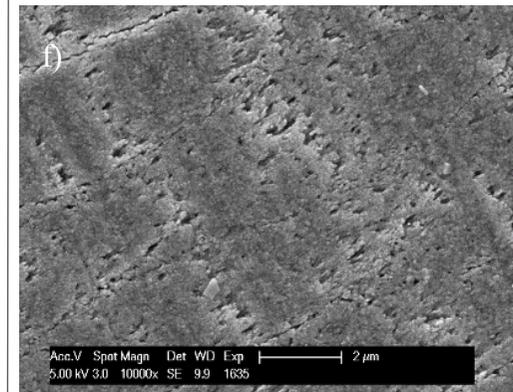
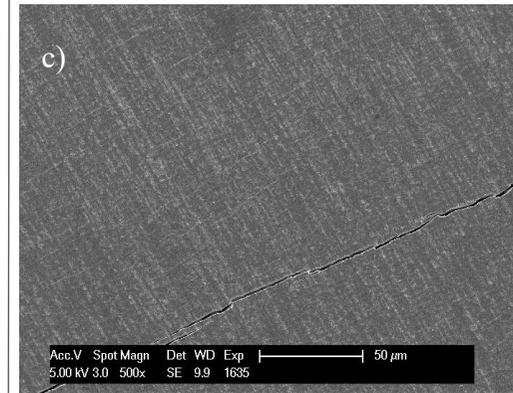
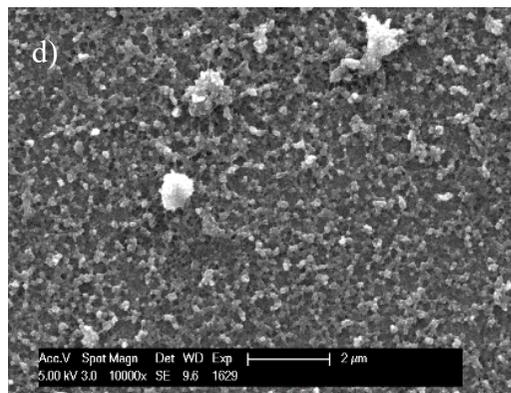
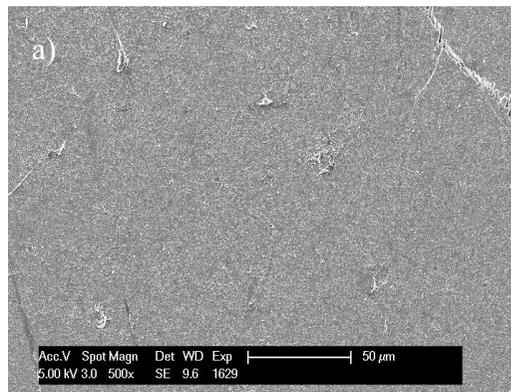
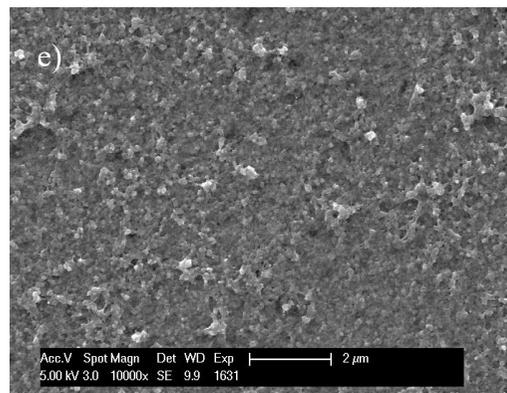
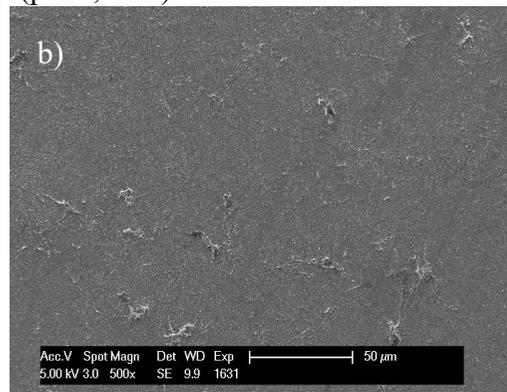


Abb. 21: REM-Aufnahmen der mit Chitosan (5 mg/ml) modifizierten Pellicel in 500 (a, b, c) und 10.000-facher (d, e, f) Vergrößerung. Nach 3 min intraoraler Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Chitosan (5 mg/ml) und die Proben wurden nach weiteren 2 h Tragezeit entnommen (a, d), zusätzliche Ätzung mit Salzsäure für 60 s zeigt erosive Veränderungen an der Schmelzprobe (b, e), nach Salzsäureätzung und zusätzlicher Reinigung mit NaOCl, Wasser im Ultraschallbad und Isopropanol sind diese erosiven Veränderungen besser erkennbar(c, f).

Vor Säureexposition



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s)



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s) und Reinigung

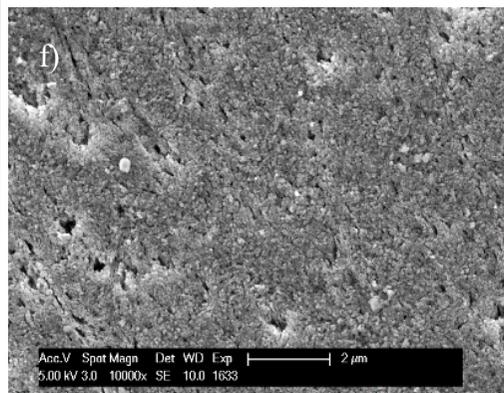
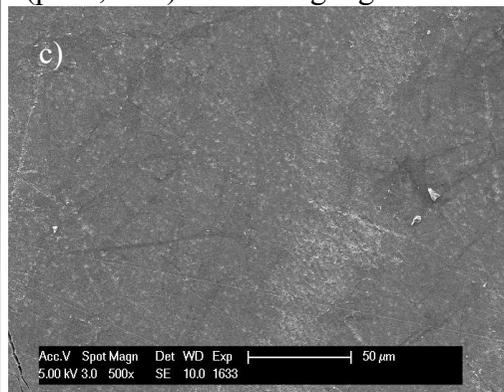
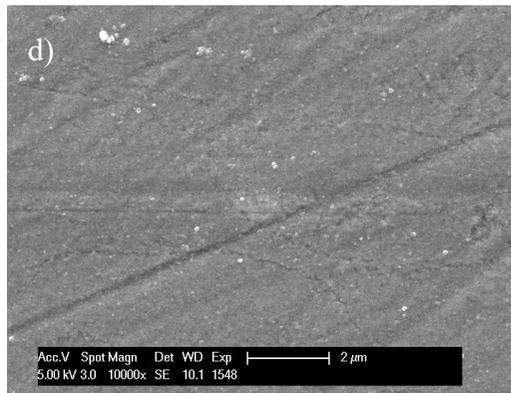
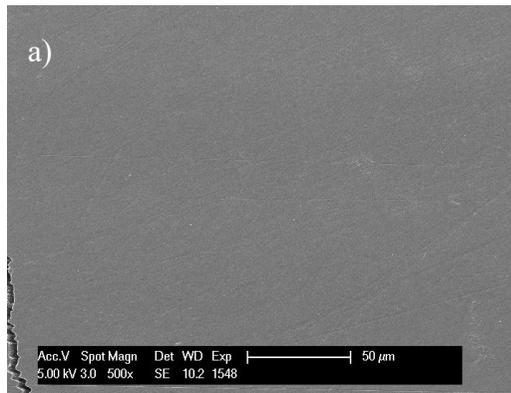


Abb. 22: REM-Aufnahmen der mit Chitosan (5 mg/ml) modifizierten Pellicel in 500 (a, b, c) und 10.000-facher (d, e, f) Vergrößerung. Nach 3 min intraoralen Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Chitosan (5 mg/ml) und die Proben wurden nach weiteren 6 h Tragezeit entnommen (a, d), zusätzliche Ätzung mit Salzsäure für 60 s zeigt erosive Veränderungen an der Schmelzprobe (b, e), nach Salzsäureätzung und zusätzlicher Reinigung mit NaOCl, Wasser im Ultraschallbad und Isopropanol sind diese erosiven Veränderungen besser erkennbar (c, f).

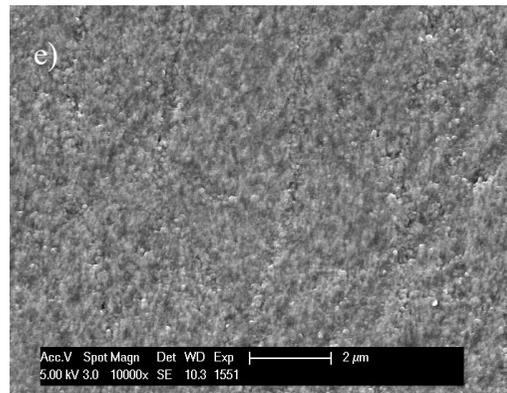
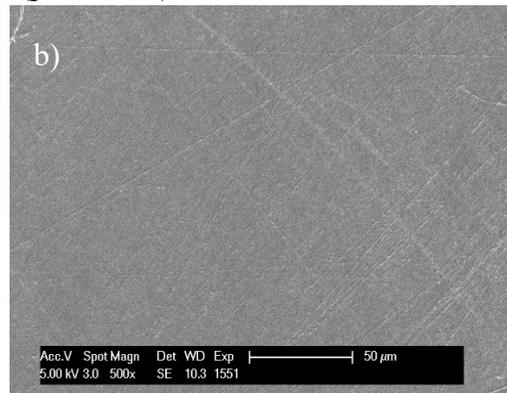
4.1.2.5 In-situ-Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt

Nach der In-situ-Behandlung mit einem experimentellen Hopfenextrakt sind große oberflächengebundene Partikel zu sehen. Nach 3 min Pellikelbildungszeit kann man vereinzelte Partikel erkennen (Abb. 23 a, d), welche nach 30 min Pellikelbildung auf der Schmelzoberfläche vermehrt vorkommen (Abb. 24, 25, 26 a, d). Trotz Säureinkubation ist eine elektronendichte Pellikel zu sehen (Abb. 23, 24, 25, 26 b, e). Die rasterelektronenmikroskopische Auswertung zeigte, dass die Erosion im Vergleich zur Wasserkontrolle in geringerem Ausmaß erfolgte. Nach dem Reinigen scheinen die Schmelzprismen jedoch in unterschiedlichem Ausmaß geöffnet. Im Falle der 3 min-Pellikel erfolgte nach der Säureinkubation die erosive Freilegung des Schmelzprismenstruktur (Abb. 23 c, d). Nach 30 min und 2 h Pellikelbildungszeit war das Ausmaß der erosiven Destruktion reduziert, die Ätzung verursachte minimale Ätzeffekte an der Schmelzoberfläche (Abb. 24, 25 c, f). Sogar nach 2 h intraoraler Tragezeit war rasterelektronenmikroskopisch weder die vollständige erosive Zerstörung der äußeren Schmelzschicht noch ein Voranschreiten des Entmineralisierungsprozess in tiefere Areale des Schmelzes festzustellen. Das Ausmaß der Ätzung nahm bei 6 h etwas zu, aber im Vergleich zu der Wasserkontrolle ist die Erosion nach 6 h Tragezeit nach der Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt weniger ausgeprägt (Abb. 26 c, f).

Vor Säureexposition



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s)



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s) und Reinigung

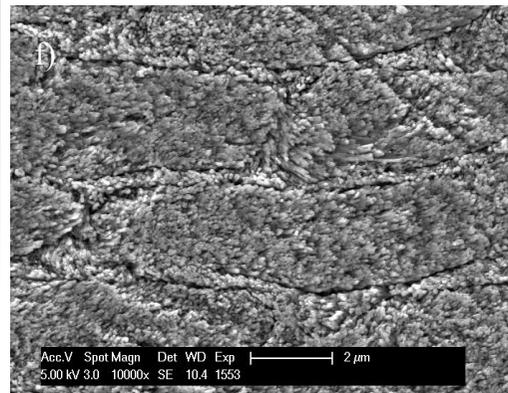
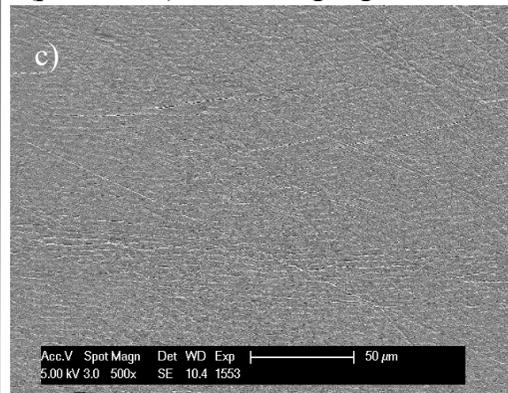


Abb. 23: REM-Aufnahmen der mit experimentellem Hopfenextrakt modifizierten Pellicel in 500 (a, b, c) und 10.000-facher (d, e, f) Vergrößerung. Nach 3 min intraoralen Expositionszeit erfolgte die Spülung mit experimentelles Hopfenextrakt und die Proben wurden entnommen (a, d), zusätzliche Ätzung mit Salzsäure für 60 s zeigt erosive Veränderungen an der Schmelzprobe (b, e), nach Salzsäureätzung und zusätzlicher Reinigung mit NaOCl, Wasser im Ultraschallbad und Isopropanol sind diese erosiven Veränderungen besser erkennbar(c, f).

Vor Säureexposition

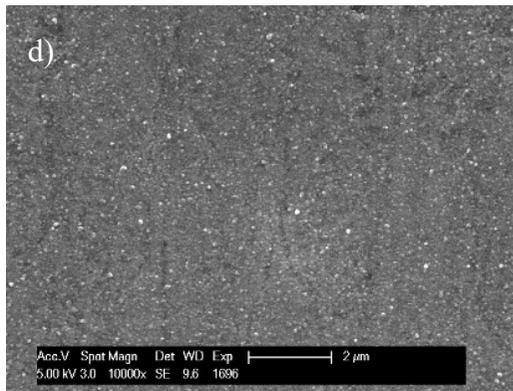
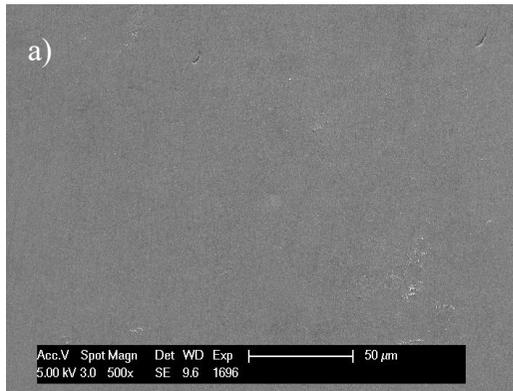
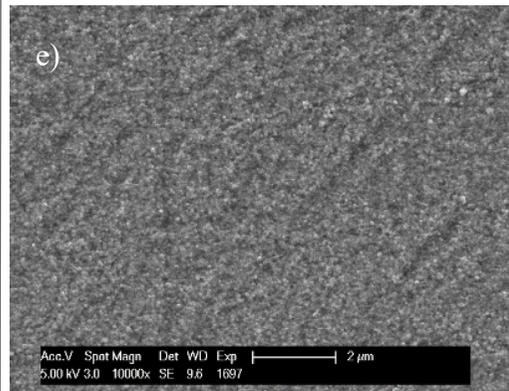
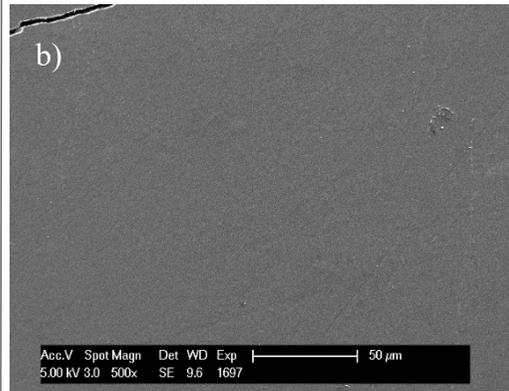
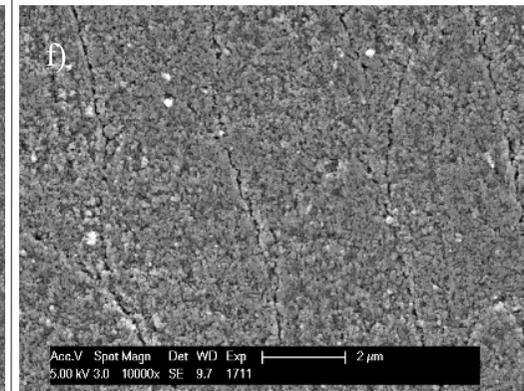
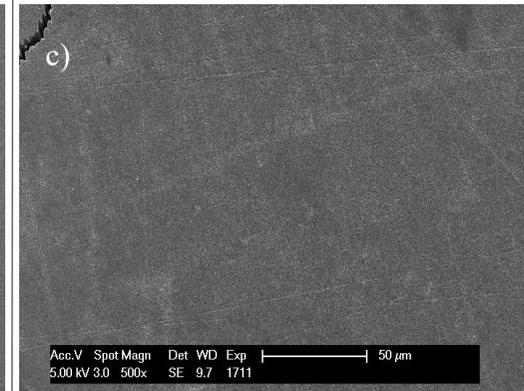
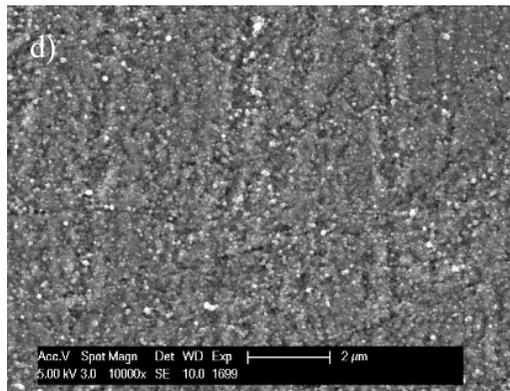
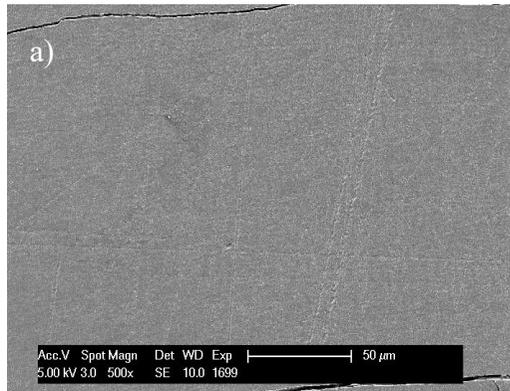
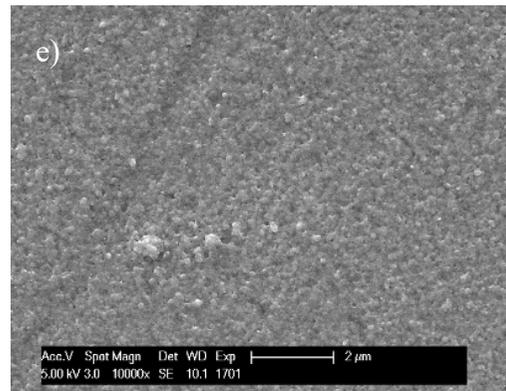
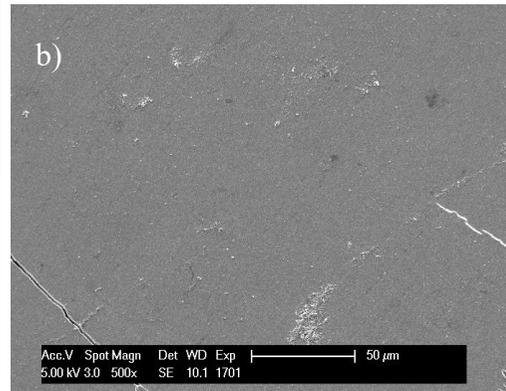
Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s)Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s) und Reinigung

Abb. 24: REM-Aufnahmen der mit experimentellem Hopfenextrakt modifizierten Pellicel in 500 (a, b, c) und 10.000-facher (d, e, f) Vergrößerung. Nach 3 min intraoralen Expositionszeit erfolgte die Spülung mit experimentelles Hopfenextrakt und die Proben wurden nach weiteren 30 min Tragezeit entnommen (a, d), zusätzliche Ätzung mit Salzsäure für 60 s zeigt erosive Veränderungen an der Schmelzprobe (b, e), nach Salzsäureätzung und zusätzlicher Reinigung mit NaOCl, Wasser im Ultraschallbad und Isopropanol sind diese erosiven Veränderungen besser erkennbar(c, f).

Vor Säureexposition



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s)



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s) und Reinigung

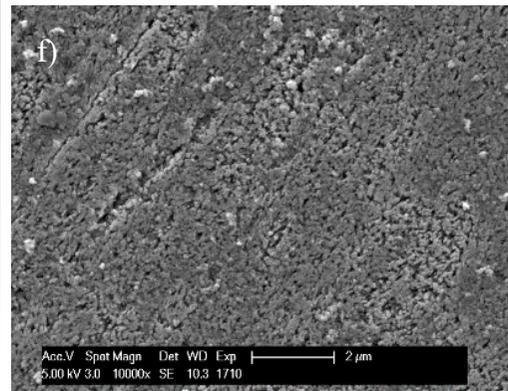
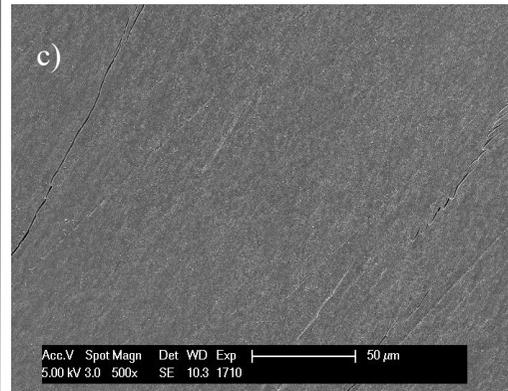
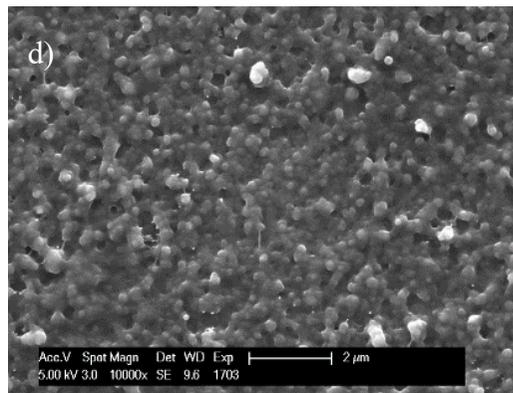
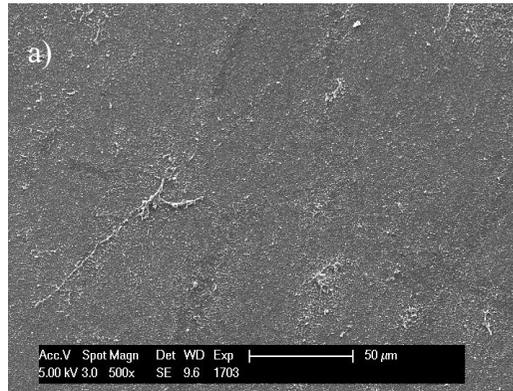
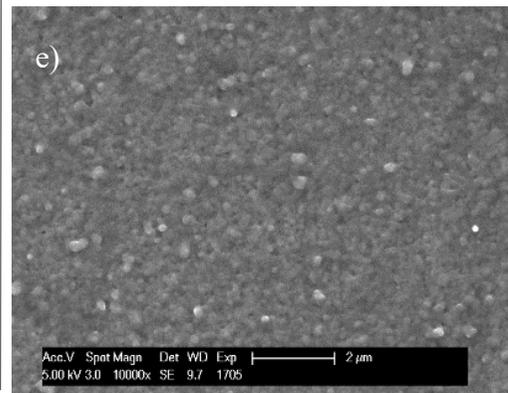
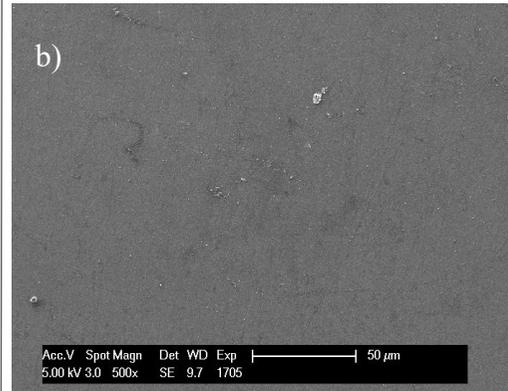


Abb. 25: REM-Aufnahmen der mit experimentellem Hopfenextrakt modifizierten Pellicel in 500 (a, b, c) und 10.000-facher (d, e, f) Vergrößerung. Nach 3 min intraoraler Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Experimentelles Hopfenextrakt und die Proben wurden nach weiteren 2 h Tragezeit entnommen (a, d), zusätzliche Ätzung mit Salzsäure für 60 s zeigt erosive Veränderungen an der Schmelzprobe (b, e), nach Salzsäureätzung und zusätzlicher Reinigung mit NaOCl, Wasser im Ultraschallbad und Isopropanol sind diese erosiven Veränderungen besser erkennbar(c, f).

Vor Säureexposition



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s)



Nach Säureexposition
(pH 2, 60 s) und Reinigung

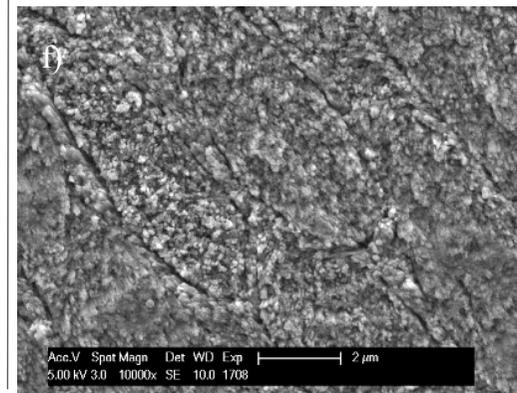
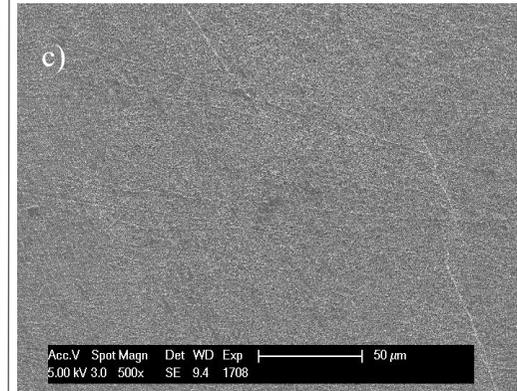


Abb. 26: REM-Aufnahmen der mit experimentellem Hopfenextrakt modifizierten Pellicel in 500 (a, b, c) und 10.000-facher (d, e, f) Vergrößerung. Nach 3 min intraoralen Expositionszeit erfolgte die Spülung mit experimentelles Hopfenextrakt und die Proben wurden nach weiteren 6 h Tragezeit entnommen (a, d), zusätzliche Ätzung mit Salzsäure für 60 s zeigt erosive Veränderungen an der Schmelzprobe (b, e), nach Salzsäureätzung und zusätzlicher Reinigung mit NaOCl, Wasser im Ultraschallbad und Isopropanol sind diese erosiven Veränderungen besser erkennbar(c, f).

4.1.3 Überprüfung der chemischen Stabilität der Pellikel

Die 3 min-Pellikel zeigte nach der In-situ-Spülung mit Wasser (Kontrollpellikel) eine kontinuierliche und homogene Schicht mit einer mittleren Dicke von $18,4 \pm 6,9$ nm (Abb. 27 a). Nach den Elutionsprotokollen in RIPA/Triton, in RIPA/Triton mit unterschiedlichen Inkubationszeiten, in RIPA/Triton mit zusätzlichem EDTA, in RIPA/Triton mit zusätzlichen Glasbeads bzw. in RIPA/Triton mit Behandlung einer Ultraschallsonde waren die 3 min-Pellikel der wassergespülten Kontrollprüfkörper komplett eluiert (Abb. 27, 28 a, c, e, g). Teilweise war die 3 min-Kontrollpellikel nach dem Elutionsprotokoll mit LDS-Puffer eluiert (Abb. 28 i).

Im Vergleich zur Kontrolle nahm die mittlere Dicke ($30,7 \pm 14,9$ nm) der mit einem experimentellen Hopfenextrakt behandelten Pellikel nach dem standardisierten Elutionsprotokoll mit Triton/RIPA gering ab (mittlere Dicke $26,0 \pm 7,1$ nm, Abb. 27 b, d).

Eine geringe Reduzierung der mittleren Dicke der mit experimentellem Hopfenextrakt behandelten Pellikelschicht zeigte sich ebenfalls nach den Elutionsprotokollen mit doppelter Konzentration der Triton/RIPA-Puffer (Abb. 27 f) und mit der Verlängerung der Inkubationszeiten in den jeweiligen Puffern (Abb. 27 h, j). Die mittleren Dicken der Pellikel betragen bei einer Erhöhung der Konzentrationen $22,0$ nm und bei der Verlängerung der Inkubation auf 30 Minuten $24,5 \pm 2,1$ nm bzw. auf 1 Stunde $28,0 \pm 4,2$ nm. Die Pellikel war bei der Verlängerung der Inkubationzeit auf 1 h teilweise unterbrochen.

Eine Elution der mit experimentellem Hopfenextrakt behandelten Pellikel mit zusätzlichem EDTA verursachte Infiltrationen innerhalb des Zahnschmelzes (Abb. 28 b). Die mittlere Dicke der Pellikel lag bei $36,3 \pm 34,2$ nm.

Im Gegensatz dazu erschien nach dem Elutionsprotokoll mit zusätzlichen Glasbeads (Abb. 28 d) und nach der Elution mit LDS-Puffer (Abb. 28 j) die Pellikel nach der experimentellen Hopfenextrakt Behandlung weniger dicht und aufgelockert, was dazu führt, dass die Pellikelschicht dicker erscheint. Die mittlere Pellikeldicken lagen bei den mit Glasbeads behandelten Pellikel bei $41,0 \pm 8,2$ nm und bei der mit LDS-Puffer behandelte Pellikel bei $446,75 \pm 226,4$ nm.

Trotz Ultraschallbehandlung in dem Triton/RIPA- Gemisch der mit experimentellem Hopfenextrakt behandelten Prüfkörper war eine elektronendichte basale Pellikel zu sehen, die von einer dickeren homogenen Schicht bedeckt war (Abb. 28 f). Die mittlere Dicke lag bei $66,5 \pm 54,4$ nm.

Die ultraschallbasierte Reinigung in jeweils Triton- und RIPA-Puffer der mit experimentellem Hopfenextrakt behandelten Prüfkörper induzierte eine komplette Elution der elektronendichten Pelikel (Abb. 28 h).

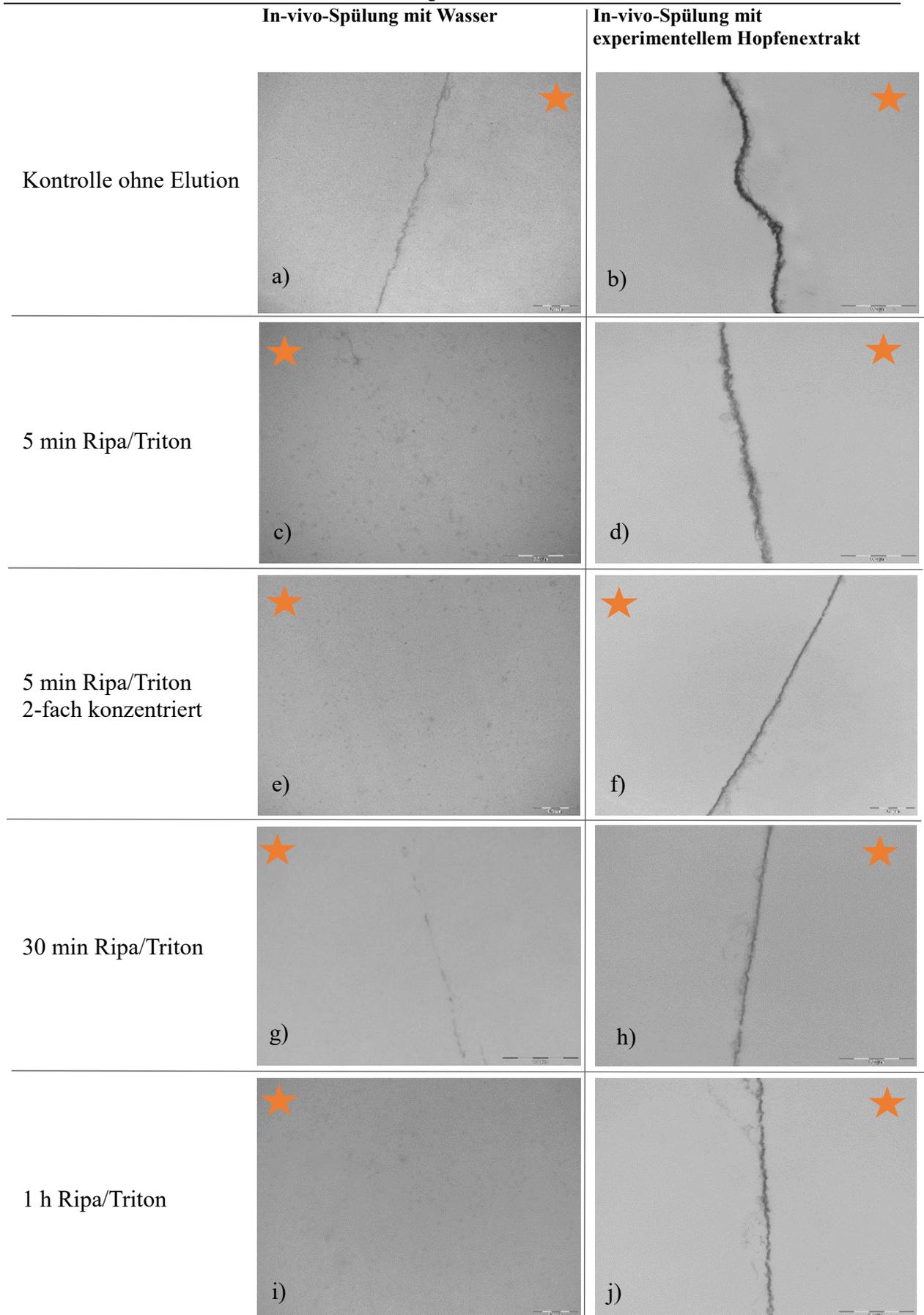


Abb. 27: TEM-Analysen: verschiedene Elutionsmethoden

3 min-Pellikel – 30 s Spülen mit Wasser bzw. experimentelles Hopfenextrakt; a, b) ohne Elution; c, d) Elution in Ripa/Triton je 5 min; e, f) Elution in Ripa/Triton 2-fach konzentriert je 5 min; g, h) Elution in Ripa/Triton je 30 min; i, j) Elution in Ripa/Triton je 1 h; ★ = ehemalige Schmelzseite.

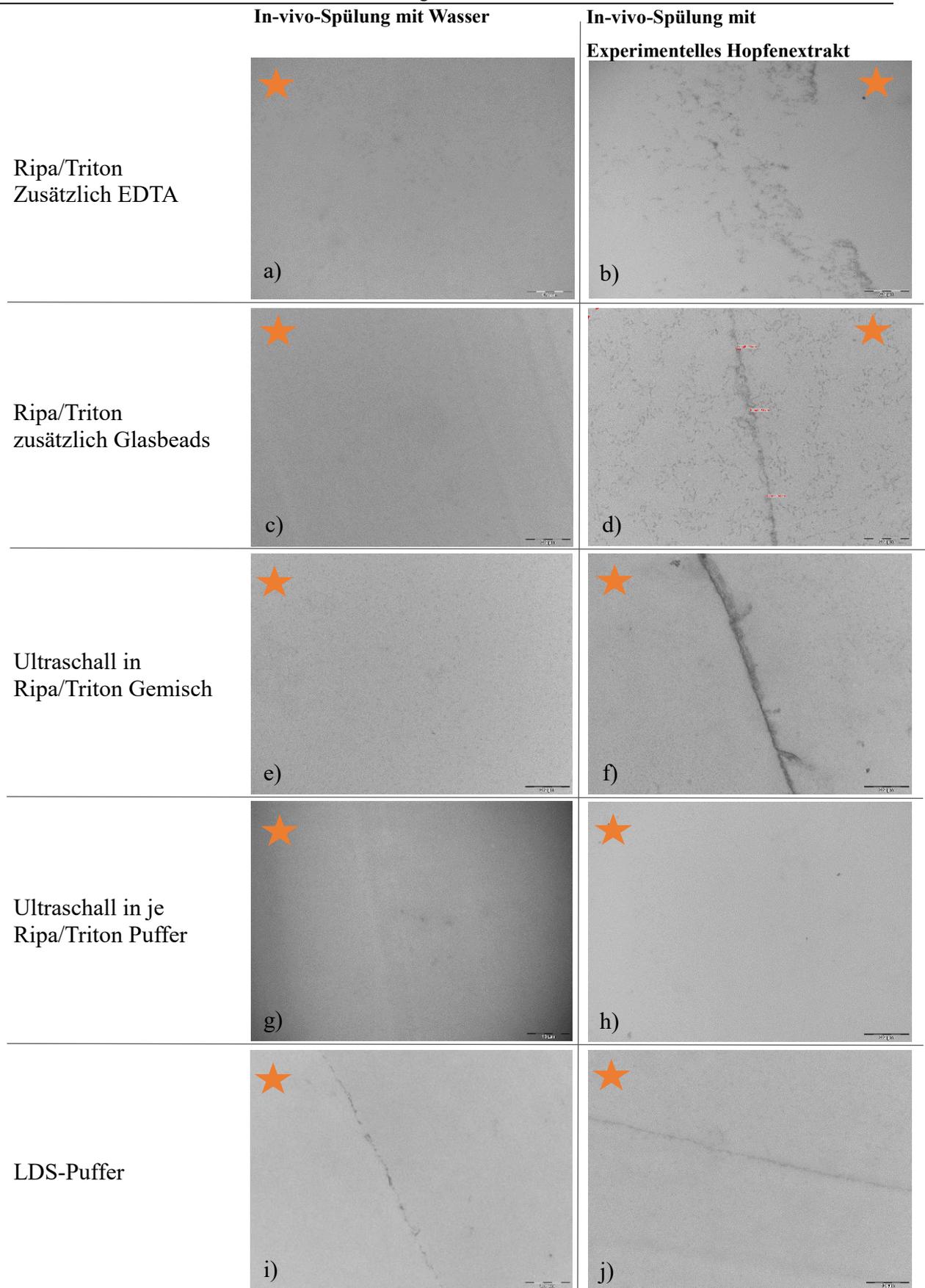


Abb. 28: TEM-Analysen: verschiedene Elutionsmethoden

3 min-Pellikel – 30 s Spülen mit Wasser bzw. experimentelles Hopfenextrakt; a, b) Elution in RIPA/Triton mit zusätzlichem EDTA; c, d) Elution in RIPA/Triton mit zusätzlichen Glasbeads; Elution in RIPA/Triton-Gemisch mit zusätzlichem Ultraschall; Elution in je RIPA/Triton Puffer mit zusätzlichem Ultraschall; Elution in LDS-Puffer; ★ = ehemalige Schmelzseite.

5 Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methoden

5.1.1 Studiendesign und Fragestellung

Die Pellikel ist eine dünne Schicht aus Proteinen auf der Zahnoberfläche (HANNIG et al., 2004; JOINER et al., 2008). Die Pellikel kann protektiv als Lubrikant wirken (BERG et al., 2003; HANNIG, JOINER, 2006) und als eine Schutzschicht gegen Erosionen dienen (AMAECHI et al., 1999; CHEAIB, LUSSI, 2011; HANNIG, 2007; HANNIG, HANNIG, 2014; HANNIG, JOINER, 2006). Um die protektiven Eigenschaften der Pellikel zu verbessern, wurde in früheren Studien bereits versucht, die Pellikel mit Polyphenolen und Pflanzenextrakten zu modifizieren (HANNIG et al., 2012; HERTEL et al., 2017; KENSCHKE et al., 2013; WEBER et al., 2015). Der Einfluss von Polyphenolen auf die Pellikel wurde ebenso in der Vergangenheit ellipsometrisch getestet (JOINER et al., 2006; JOINER et al., 2004; JOINER et al., 2003). Ein positiver Effekt konnte auf die Schutzfunktion der Pellikel dargestellt werden. In der vorliegenden In-situ-Studie wurden nun weitere Versuchsreihen mit Naturextrakten durchgeführt. Die erosionsprotektive Wirkung der Naturextrakte wurde direkt auf der mit einer Pellikel unterschiedlicher Bildungszeit bedeckten Schmelzoberfläche untersucht. Dazu wurden transmissionselektronen- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

5.1.2 Gewinnung und Herstellung von Schmelzprüfkörpern

Sowohl humane als auch bovine Zähne werden in Studien zur Biofilmbildung sowie zur Biofilmbildungskontrolle verwendet. Rinderzähne werden als ein geeigneter Ersatz für menschliche Zähne angesehen (JUNG et al., 2010; WANG et al., 2012; WEGEHAUPT et al., 2008; WEGEHAUPT et al., 2010). Rinderzähne haben ähnliche physikochemische Eigenschaften wie menschliche Zahnhartsubstanz (NAKAMICHI et al., 1983). Aufgrund der einheitlichen Ernährung der Tiere ist es einfacher, homogene und standardisierte Proben zu ermöglichen. Außerdem sind größere

Oberflächen von Rinderzähnen im Vergleich zu menschlichen Zähnen zu realisieren. Insbesondere spielt die Kariesfreiheit eine wichtige Rolle. Außerdem sind Rinderproben viel leichter zugänglich, um den Bedarf an Proben für die Zahnforschung zu decken. Bereits in den früheren Studien wurde die Pellikelbildung auf Rinderzähnen untersucht (HANNIG et al., 2004). In der vorliegenden Studie wurden alle Schmelzprüfkörper von jungen Rindern aus der gleichen Region unter Berücksichtigung der gleichen Umweltfaktoren und des vergleichbaren Niveaus der Zahnmineralisierung gewonnen. Um standardisierte Prüfkörper herzustellen und um den Einfluss der Oberflächenrauheit auf die Pellikelbildung zu unterbinden, wurde eine Politur der Probenoberflächen mit Nassschleifpapier bis zu einer Korngröße von 4000 Grit durchgeführt. Die Prüfkörperoberflächen wurden anschließend lichtmikroskopisch kontrolliert.

5.1.3 Pellikelbildung

Viele In-vitro-Modelle und einige In-situ-Modelle wurden zur Untersuchung der Biofilmbildung sowie des Einflusses chemischer Substanzen auf die Biofilmentwicklung eingesetzt. Die Adhäsion von Proteinen an die Schmelzoberfläche in-vitro unterscheidet sich deutlich von den In-vivo-Bedingungen (HANNIG, HANNIG, 2009). Ein Vorteil der In-vitro-Biofilmmodelle ist die Reproduzierbarkeit. Im Unterschied zu In-vivo-Untersuchungen können keine individuellen Unterschiede auftreten. Studien zum bakteriellen Vitalitätsmuster zeigen, dass die Ergebnisse von In-vivo-Studien mit denen von In-vitro-Studien nicht übereinstimmen (VAN DER MEI et al., 2008; VAN DER MEI et al., 2006).

Unter Berücksichtigung der genannten Nachteile von In-vitro-Modellen hat das In-situ-Modell den Vorteil, dass es genau das Bild der Situation in der Mundhöhle zeigen kann. Es kann auch das tatsächliche Potential von Mundspülungen widerspiegeln und ist daher relevant für die Prüfung der klinischen Wirksamkeit. Um den Einfluss der oralen Umgebung und das Vorhandensein von Speichel während der Exposition gegenüber den natürlichen Extrakten zu untersuchen, wurden die vorliegenden Experimente unter In-situ-Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden orale, herausnehmbare Trageschienen für die Molarregionen im Oberkiefer angewendet. Der Gaumen war nicht durch die Schienen bedeckt, sodass die Speichelsekretion der palatinalen Speicheldrüsen nicht beeinflusst wurde. Jedoch wurde die Sulci gingivalis im Bereich vom ersten bis zum zweiten Molaren bedeckt, dadurch könnte die Sekretion der Sulkusflüssigkeit eingeschränkt werden. Sowohl Speichelkomponenten als auch die Sulkusflüssigkeit spielen bei der Pellikelbildung eine Rolle (SIQUEIRA et al., 2012).

In dieser Studie werden alle Proben mittels President® an den Schienen montiert. Die reproduzierbar definierte Position der Proben kann mögliche Einflüsse auf die Biofilmbildung ausschließen (HANNIG, 1999). Im bukkalen Bereich gebildeter Biofilm ist in zahlreichen früheren Studien untersucht worden und somit erlaubt diese intraorale Region einen Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit früheren Studien.

5.1.4 Probandenselektion

An den In-situ-Versuchen nahmen 3 Probanden teil. Eine Limitation der vorliegenden Studie ist die geringe Anzahl der Probanden. Die große Anzahl unterschiedlicher experimenteller Gruppen und die Komplexität der experimentellen und analytischen Methoden setzen eine sehr gute Verfügbarkeit und Compliance der Probanden über einen längeren Zeitraum voraus, so dass nur eine kleine Zahl freiwilliger Probanden in diese Studie, die über viele Monate durchgeführt wurde, involviert werden konnte. In Bezug auf die Proteinzusammensetzung der Pelli-
kel konnten in einer früheren Studie keine großen interindividuellen Unterschiede aufgedeckt werden (SIQUEIRA et al., 2007b). Vor Beginn der Studie wurde eine allgemeine Anamnese der Probanden erhoben. Die Ausschlusskriterien waren die Einnahme von Medikamenten, Alkohol- und Nikotinkonsum, Erkrankungen der Speicheldrüsen oder Allgemeinerkrankungen. Kariöse Läsionen, Zahnfleischerkrankungen und Erkrankungen der Mundschleimhaut wurden ebenfalls ausgeschlossen. So sollten alle Einflussfaktoren ausgeschaltet werden, die eine veränderte Pelli-
kelbildung nach sich ziehen könnten.

5.1.5 Versuchsbedingungen

Um die inter- und intraindividuellen Variationen zu reduzieren, wurden die Versuchsbedingungen streng reglementiert und die Probanden ausführlich informiert. Jede Versuchsreihe begann zwischen 9:00 und 9.30 Uhr morgens, um den Einfluss des Rhythmus des Speichelflusses auf die Biofilmbildung auszuschließen. 30 Minuten vor dem Versuch und nach dem Essen mussten die Probanden die Mundhöhle mit Zahnbürsten ohne Zahnpasta reinigen. Um den Effekt saurer Getränke auszuschließen, durften die Probanden im Verlauf jeder Runde nur Wasser zu sich nehmen (CHEAIB, LUSSI, 2011; HANNIG et al., 2012).

In der In-situ-Studie wurden die Proben teilweise direkt nach 3 min Tragezeit aus der Mundhöhle entfernt, nachdem der Mund mit einem natürlichen Extrakt gespült worden war. Eine weitere Probenuntergruppe wurde intraoral für weitere 30 Minuten, 2 h und 6 h getragen, um die anhaltende Wirkung der Naturstoffe in der Mundhöhle zu untersuchen.

In einer vorangegangenen Studie wurde ebenso der Einfluss von Pflanzenextrakten auf die erosionsprotektive Wirkung der Pellikel untersucht (WEBER et al., 2015). Hier wurden die Prüfkörper 1 min getragen. Danach wurde eine 10-minütige Ex-vivo-Spülung durchgeführt und die Proben weitere 19 oder 28 min in-situ getragen. Dabei konnten die erosionsprotektiven Eigenschaften einer Spülung mit wässrigen Extrakten von Origanum- und Ribes nigrum-Blättern aufgezeigt werden (WEBER et al., 2015).

In der vorliegenden In-situ-Studie erfolgte die Spülung mit den Spüllösungen nach 3 min Tragezeit, um die Anwendung der Mundspülungen kurz nach dem Zähneputzen zu simulieren. Die Spülung dauerte nur 30 s. Im Vergleich zu früheren Studien bedeutete dies eine verkürzte und realistische orale Applikationsdauer der Spüllösungen. Die Anwendungsdauer einer konventionellen Mundspüllösung beträgt üblicherweise einmalig 30 s (HANNIG et al., 2013). Die Versuche dauerten in dieser Studie bis zu maximal 6 h.

Die Erosion der Prüfkörper erfolgte ex-vivo. Die Durchführung dieser Experimente zielte darauf ab, den Effekt der Spüllösungen auf die erosionsprotektiven Eigenschaften der Pellikel zu untersuchen. Für die künstliche Erosion der pellikelbedeckten und der pellikelfreien Prüfkörper wurde wie in vielen früheren Studien (HANNIG et al., 2012; WEBER et al., 2015) 0,01 M Salzsäure mit dem pH-Wert von 2 verwendet. Dieser Wert nähert sich dem pH-Wert einiger saurer Getränke mit einem pH-Wert von circa 1,8 an (WEBER et al., 2015). Die In-vitro-Inkubation von 1 min in der Salzsäure soll die Verweildauer der Getränke in der Mundhöhle bei dem Verzehr von sauren Säften widerspiegeln (HANNIG, BALZ, 1999). In dieser Studie wurden die Proben zusätzlich unter ständiger Bewegung in Säure inkubiert, um den Spüleffekt bei der Nahrungs- und Getränkeaufnahme nachzuahmen. Es wurde nachgewiesen, dass unter statischen Bedingungen die erosiven Einflüsse schwerwiegender sind als unter Bewegung (MAUPOME et al., 1999). Die Salzsäure kann auch die erosive Wirkung durch Erbrechen imitieren.

Jedoch kann die Ex-vivo-Säureinkubation nicht eins zu eins auf die Mundhöhle übertragen werden. Speichel kann aufgrund seiner Pufferkapazitäten, Verdünnungskapazitäten und Remineralisationskapazitäten das Ausmaß der Erosionen beeinflussen (LUSSI et al., 2004; SREEBNY, 2000). Sowohl diese physiologischen Schutzmechanismen als auch die Scherkräfte der Zunge wurden in dieser Studie nicht berücksichtigt.

5.1.5.1 Chemische Elution

Die chemische Elution der Pellikel von der Schmelzoberfläche wurde in vorangegangenen Studien mittels NaOCl (MEURMAN, FRANK, 1991) oder einer Kombination aus NaOCl und Ultraschallaktivierung durchgeführt. Die Kombination aus chemischem und ultraschallaktivem Verfahren scheint eine gute Methode zur Entfernung der Pellikel zu sein (HANNIG et al., 2005). Die chemische Elution diente zur Entfernung von Pellikelresiduen im Rahmen der morphologischen Analyse der Oberfläche der Prüfkörper nach der Behandlung mit Salzsäure mittels Rasterelektronenmikroskopie. So kann mittels rasterelektronenmikroskopischer Untersuchung die erosionsprotektive Wirkung der modifizierten Pellikel auf den Schmelzoberflächen direkt visualisiert werden. Nach neusten Studien wurde ein weiteres, vielfältigeres Verfahren zur Elution der Pellikel gewählt (DELIUS et al., 2017). Durch die Kombination von zwei verschiedenen Elutionspuffern (Triton X-100/ RIPA) werden die verschiedenen chemischen Bindungen zwischen der Pellikel und dem Schmelz angegriffen (DELIUS et al., 2017). Der Triton X-100-Puffer eignet sich zum Lösen von Proteinkomplexen und Protein-Lipidkomplexen. Der RIPA-Puffer kann Interaktionen zwischen den funktionellen Gruppen der Proteine und Kalziumionen vom Schmelz aufbrechen (DELIUS et al., 2017; KENSCHKE et al., 2017). Eine Modifizierung des initialen Biofilms durch Naturextrakte könnte die Eigenschaft der Pellikel ändern. Um die chemische Stabilität der modifizierten Pellikel zu untersuchen, wurde eine Kombination verschiedener Puffer untersucht. Die vollständige Entfernung der Pellikel ist von Relevanz, damit eine spätere Analysierung von Proteinen der modifizierten Pellikel durchgeführt werden kann.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Erosionsschutz

Unter Verwendung von TEM und REM wurden die durch natürliche Extrakte induzierten morphologischen Veränderungen der Pellikel deutlich sichtbar. Nach der Ätzung mit Salzsäure wurden an den Schmelzproben erosive Veränderungen festgestellt, deren Ausmaß von den Spüllösungen abhängig war. Das Spektrum der erosiven Veränderungen an der pellikelbedeckten Schmelzoberfläche reichte, in Abhängigkeit der Testlösung, von der initialen Demineralisierung bis hin zur vollständigen Freilegung der Schmelzprismenstruktur.

Die TEM-Analyse zeigte, dass die 3 min-Pellikel nach der In-situ-Spülung mit Wasser (Kontrollbiofilm) an der Schmelzoberfläche in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen durch eine homogene Ultrastruktur mit körnigem Aussehen gekennzeichnet war (HANNIG, 1999). Es sind zwei Schichten - eine basale Schicht und die äußere Schicht - an der Schmelzoberfläche zu erkennen. Der 30 min In-situ-Biofilm war durch eine unregelmäßige Oberflächenkontur gekennzeichnet (Abb. 12 d). Nach 6 h intraoraler Exposition konnte eine kontinuierliche und homogene Pellikelstruktur auf der gesamten Oberfläche beobachtet werden (Abb. 14 d).

Die mit den unterschiedlichen Lösungen behandelten Pellikelproben zeigten meist eine heterogenere Oberflächentopographie. Im Gegensatz zum Kontrollbiofilm schien die mit experimentellem Hopfenextrakt behandelte Pellikelstruktur elektronendichter zu sein. Die Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt stellte eine vergleichsweise dichtere, globulär strukturierte Schicht dar, die durch die TEM-Bilder veranschaulicht wurde. Daher zeigte diese auch antierosive Eigenschaften (Abb. 24 f). Trotz der interindividuellen Schwankungen, die bei der Morphogenese des Biofilms beobachtet wurden, wurde eine Säureresistenz der mit experimentellem Hopfenextrakt behandelten Pellikel nach 30 min Tragezeit gezeigt. Der Hauptbestandteil dieser Lösung ist die Hopfenpflanze. Das Extrakt von Hopfenblättern zeigte in früheren Studien mehrere vorteilhafte Wirkungen gegen Karies (SHINADA et al., 2007; TAGASHIRA et al., 1997). Bei der Untersuchung der antikariogenen Wirkung wurde vermutet, dass hochmolekulare Polyphenole (etwa 36 000 bis 40 000 Da) von Hopfenblättern die Zelladhärenz von kariogenen Bakterien wie z.B. *Streptococcus mutans* und *S. sobrinus* hemmten. Außerdem trat dies bei viel niedrigeren Konzentrationen auf als beim grünen Tee oder Oolong-Tee (TAGASHIRA et al., 1997). In einer Studie wurde auch gezeigt, dass Hopfen als Mundspüllösung die Plaquebildung unterdrückt. Die Ergebnisse zeigten, dass die durchschnittliche Menge an Plaque und

die Anzahl der Mutans-Streptokokken in den Plaque-Proben nach der Verwendung der Hopfen-Mundspülung signifikant geringer waren als nach der Verabreichung des Placebos (SHINADA et al., 2007). Darüber hinaus wurde in einer Untersuchung ein Parodontitis reduzierender Effekt berichtet (INABA et al., 2005). Polyphenole von Hopfenblättern hemmten die zelluläre PGE₂-Produktion, die durch *Porphyromonas gingivalis*, einen wichtigen Erreger der Parodontitis, induziert wurde (INABA et al., 2008), und einige bakterielle Toxine (MORINAGA et al., 2005). Tanninsäure (10 mg/ml) verursachte ebenfalls elektronendichtere Pellikel im Vergleich zur Kontrolle (HANNIG, JOINER, 2006; JOINER et al., 2006; JOINER et al., 2004; JOINER et al., 2003). Polyphenole induzierten im Vergleich zur Kontrollpellikel in-vitro und in-situ besonders dicke und elektronendichte Pellikelschichten (REHAGE et al., 2017). Eine ähnliche Pellikel-Verdickung wurde nach der In-situ-Behandlung mit wässrigen Extrakten von *Origanum*- und *Ribes nigrum*-Blättern beobachtet (WEBER et al., 2015). In einer weiteren Studie wurde auch beschrieben, dass Pflanzenpolyphenole, wie Epigallocatechingallat, z. B. im grünen Tee-Extrakt, die Zähigkeit und Dicke der proteinartigen Pellikelschicht verbessern und die Schutzeigenschaften der Pellikel gegen erosive Noxen erhöhen (JOINER et al., 2004; JOINER et al., 2003). Adstringensinduzierte ultrastrukturelle Veränderungen der Zahnpellikel können die schützenden Eigenschaften in Bezug auf die Erosion der Zähne beeinflussen (HERTEL et al., 2017; WEBER et al., 2015). Möglicherweise aggregieren die sekundären Pflanzenstoffe die Speichelproteine, was deren Adsorption an die Schmelzoberfläche erleichtert (HANNIG, HANNIG, 2014). Darüber hinaus können Gerbung und Denaturierung stattfinden, was zu einer elektronendichteren und möglicherweise weniger durchlässigen Pellikelschicht führt (HANNIG, JOINER, 2006; JOINER et al., 2006; JOINER et al., 2004; JOINER et al., 2003). Polyphenole können auch die Löslichkeit der adsorbierten Proteine auf der Schmelzoberfläche reduzieren, indem sie Querverbindungen zwischen den adsorbierten Proteinen ausbilden (JOINER et al., 2006; JOINER et al., 2003). In einer Studie wurde der antikariogene Effekt von polyphenolischen Gruppen nachgewiesen (OTAKE et al., 1991). Hier wurden Ratten im Laufe der Studie mit einer kariogenen Nahrung gefüttert. In der Testgruppe waren zusätzlich Polyphenole aus grünem Tee enthalten, in der Kontrollgruppe enthielt die Nahrung keine polyphenolischen Gruppen. Die Testgruppe wies geringere Karieszahlen auf als die Kontrollgruppe. Der Kontakt mit Chitosan (5 mg/ml) verursachte eine Zunahme der Pellikeldicke, die sogar 30 Minuten nach der In-situ-Behandlung noch verstärkt wurde. Chitosane adsorbieren gut an die Pellikel und bewirken dadurch eine positiv geladene und hydrophobere Oberfläche (BUSCHER et al., 2008). Die Bindung von Chitosan an Pellikelproteine mit weiterer Anlagerung von Speichelproteinen könnte die beobachtete inkrementelle Pellikel-Verdickung innerhalb der

Mundhöhle und die Säureresistenz erklären. Biofilme, die auf den Proben nach dem Spülen mit Chitosan (5 mg/ml) gebildet wurden, zeigten mittels REM eine ausgeprägte Komplexität der Pellikelstruktur im Vergleich zu den anderen Gruppen. Nach einer Tragezeit von 2 Stunden war eine dickere Pellikelschicht auf der gesamten Schmelzoberfläche zu sehen. Globuläre Oberflächenauflagerungen, die die Schmelzprismen bedeckten, könnten damit den erosiven Einfluss minimieren.

Die rasterelektronenmikroskopischen Resultate lassen den Schluss zu, dass die Pellikel den Zahnschmelz in begrenztem Umfang vor erosiven Einflüssen schwacher Säuren zu schützen vermag. Die REM-Analysen bestätigen die TEM-Ergebnisse. Bei Anwesenheit der Pellikel auf den Prüfkörpern traten die Entmineralisierungserscheinungen an der Schmelzoberfläche in reduziertem Umfang auf. Einige REM Bilder (Abb. 12-19 f, 23 f und 26 f) zeigen jedoch nach der Ätzung und Reinigung entmineralisierte Schmelzoberflächen, welche vor dem Reinigen nicht zu sehen waren. Die Resultate deuten darauf hin, dass die junge Pellikel permeabel für die Säure ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine 3 min-Kontrollpellikel ähnliche Schutzfunktion aufweist wie eine 2 h-Pellikel. Man kann also davon ausgehen, dass eine reifere Pellikel die Schutzfunktion nicht deutlich verbessert (HANNIG et al., 2004), was auch mit früheren Ergebnissen aus In-vitro- und In-vivo-Studien über die antierosive Eigenschaften übereinstimmt. Die vorliegende Studie macht deutlich, dass die protektive Wirkung der Pellikel bei der säurebedingten Erosion der Schmelzoberfläche limitiert ist und von der Modifizierung durch Spüllösungen abhängt. Der Schutz vor Erosionen hängt nicht nur von der Dicke der Pellikel ab, sondern auch von ihrer Zusammensetzung (HANNIG, JOINER, 2006). Die modifizierte Pellikel kann die schützenden Eigenschaften der Pellikel positiv gegen Zahnerosion beeinflussen (WEBER et al., 2015).

5.2.2 Überprüfung der chemischen Stabilität der Pellikel

Die komplette Entfernung von Biofilmen aus Biomaterialien ist nach wie vor eine herausfordernde Aufgabe. Insbesondere für Untersuchungen an realen Oberflächen ist die Wiederverwendung von Proben von großer Bedeutung, da die Wiederverwendung den Vergleich derselben Probe in verschiedenen Experimenten ermöglicht. Ziel einer Studie war es, die Reinigungsleistung verschiedener Lösungsmittel (SDS, Wasser, Aceton, Isopropanol, RIPA-Puffer und Tween-20) an fünf verschiedenen Biomaterialien (Titan, Gold, PMMA, Keramik, und PTFE), die mit Schichten aus zwei verschiedenen adsorbierten Proteinen (BSA und Lysozym) bedeckt

waren, zu testen (KRATZ et al., 2015). Nach der Behandlung der Oberflächen mit den verschiedenen Lösungsmitteln wurden die auf der Oberfläche verbleibenden Proteine mittels BCA-Assay bestimmt. Die Daten dieser Studie zeigen, dass RIPA-Puffer und Tween-20 wirksame Lösungsmittel sind. Sie wiesen nach Reinigung auf allen untersuchten Materialoberflächen sehr geringe Restproteinmengen auf. RIPA-Puffer entfernte in Kombination mit Ultraschall die Proteinschicht vollständig, wie durch TEM bestätigt wurde.

Eine vollständige Entfernung der Pellikel ist auch für eine spätere Analyse von Proteinen der modifizierten Pellikel von Relevanz. Nach neusten Studien wurde ein weiteres, vielfältigeres Verfahren zur Elution der Pellikel gewählt (DELIUS et al., 2017). Durch die Kombination von zwei verschiedenen Elutionspuffern (Triton X-100/ RIPA) werden die verschiedenen chemischen Bindungen zwischen der Pellikel und dem Schmelz angegriffen (DELIUS et al., 2017). Der Triton X-100-Puffer eignet sich zum Lösen von Proteinkomplexen und Protein-Lipidkomplexen. Der RIPA-Puffer kann Interaktionen zwischen den funktionellen Gruppen der Proteine und Kalziumionen vom Schmelz aufbrechen (DELIUS et al., 2017; KENSCHKE et al., 2017). Eine Modifizierung des initialen Biofilms durch Naturextrakte könnte die Eigenschaft der Pellikel ändern, somit die komplette Elution verhindern.

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass die modifizierte Pellikel stabiler gegenüber chemischen Einflüssen ist als die Wasserkontrolle. Die Spülung mit einem experimentellen Hopfenextrakt stellte eine vergleichsweise dichtere, globulär strukturierte Schicht dar, die durch die TEM-Bilder veranschaulicht wurde. Durch die unterschiedlichen Elutionsprotokolle wurde die chemische Stabilität der Pellikel unter Extrembedingungen untersucht. Bei der Wasserkontrolle wurde gezeigt, dass die Pellikel nach jedem Elutionsprotokoll komplett von der Schmelzoberfläche entfernt wurde. Im Gegensatz dazu schien die mit experimentellem Hopfenextrakt behandelte Pellikelstruktur elektronendichter zu sein. Auch die chemische Stabilität nahm zu. Nur mit einem Elutionsprotokoll, in dem die Proben in RIPA- und Triton-Puffer inkubiert wurden und mit einer Ultraschallsonde behandelt wurden, konnte man die Pellikel unter Extrembedingungen komplett von der Schmelzoberfläche entfernen.

Aber auch die Versuchsreihen nach der Salzsäureexposition lassen Rückschlüsse auf die chemische Stabilität zu. Das Ausmaß der experimentell erzeugten Schmelzerosionen wurde durch die Spüllösungen bestimmt. Die rasterelektronenmikroskopische Auswertung zeigte, dass die Erosion an der mit experimentellem Hopfenextrakt modifizierten Pellikel im Vergleich zur Wasserkontrolle in geringerem Ausmaß erfolgte. Die Spülung mit experimentellem Hopfenex-

trakt zeigte antierosive Eigenschaften (Abb. 24 f). Es wurde eine Säureresistenz der mit experimentellem Hopfenextrakt vorbehandelten Proben nach 30 min Tragezeit gezeigt. Es ließen sich nach der Ätzung keine Anzeichen einer initialen Schmelzerosion feststellen.

In früheren Studien zeigte das Extrakt von Hopfenblättern mehrere vorteilhafte Wirkungen gegen Karies (SHINADA et al., 2007; TAGASHIRA et al., 1997). In einer weiteren Studie wurde auch gezeigt, dass Hopfen als Mundspüllösung die Plaque-Bildung unterdrückt (SHINADA et al., 2007). Darüber hinaus wurde in einer Untersuchung der Effekt der Antiperiodontitis berichtet (INABA et al., 2005). Polyphenole von Hopfenblättern hemmten die zelluläre PGE₂-Produktion, die durch *Porphyromonas gingivalis*, einen wichtigen Erreger der Parodontitis, induziert wurde (INABA et al., 2008), und einige bakterielle Toxine (MORINAGA et al., 2005). Eine Modifizierung des initialen Biofilms durch Hopfen könnte auch die Zusammensetzung der Pellikel ändern und dabei die Permeabilität für saure Noxen reduzieren.

5.2.3 Antiplaquemittel

Die Modifizierung der Pellikel könnte auch eine Störung der Adhäsion von oralen Bakterien auf der Pellikeloberfläche bedeuten. Basierend auf dieser Idee, sind Antiplaquemittel für die Biofilmkontrolle und Primärprävention die optimale Option. Um die Biofilmbildung zu beeinflussen, sollten die Wirkstoffe, die in die Mundhöhle abgegeben werden, das biologische Gleichgewicht nicht stören. Bemerkenswert ist, dass auch Chitosan (BUSSCHER et al., 2008) und Polyphenole (HANNIG et al., 2009) das orale Bakterienwachstum hemmten. Nur mit einer langen oralen Verfügbarkeit sind chemische Ansätze in-vivo wirksam (NETUSCHIL et al., 2003). Ob diese Pflanzenextrakte an kariogenen Bakterien antibakterielle Eigenschaften haben oder die orale Biofilmbildung verzögern, erfordert weitere Untersuchungen.

5.3 Schlussfolgerungen / Konklusionen

Verschiedene Spüllösungen bewirken ultrastrukturelle Pellikelveränderungen. Die durch die Naturstoffe induzierte Pellikelverdickung kann die schützenden Eigenschaften der Pellikel gegenüber Zahnabnutzung erhöhen. Die unterschiedlichen Spüllösungen (Tanninsäure (10 mg/ml), Chitosan (5 mg/ml) und experimentelles Hopfenextrakt) zeigten einen stärkeren säureprotektiven Effekt gegenüber der Spülung mit Wasser. Es lässt sich sagen, dass die Pellikel einen Schutzeffekt gegenüber Erosion aufweist. Allerdings kann die erosive Wirkung nicht vollständig verhindert werden.

Die Salzsäureexposition lässt aber auch Rückschlüsse auf die chemische Stabilität zu. Es wurde gezeigt, dass die modifizierte Pellikel stabiler gegenüber chemischen Einflüssen ist als die Wasserkontrolle. Die rasterelektronenmikroskopische Auswertung zeigte, dass die Erosion an der mit experimentellem Hopfenextrakt modifizierten Pellikel im Vergleich zur Wasserkontrolle in geringerem Ausmaß erfolgte. Es ließen sich nach der Ätzung keine Anzeichen einer initialen Schmelzerosion feststellen. Des Weiteren wurde die chemische Stabilität unter Extrembedingungen durch die unterschiedlichen Elutionsprotokolle der Pellikel untersucht. Bei der Wasserkontrolle wurde gezeigt, dass die Pellikel nach jedem Elutionsprotokoll teilweise bis komplett von der Schmelzoberfläche entfernt wurde. Im Gegensatz dazu schien die mit experimentellem Hopfenextrakt behandelte Pellikelstruktur stabiler gegenüber chemischer Einflüsse zu sein. Nur mit dem Elutionsprotokoll, in dem die Prüfkörper in Triton- bzw. RIPA-Puffer inkubiert und mit einer Ultraschallsonde behandelt wurden, konnte man in dieser Arbeit jedoch auch die modifizierte Pellikel komplett von der Schmelzoberfläche entfernen.

Ob die in der vorliegenden Studie untersuchten Pflanzenextrakte an kariogenen Bakterien antibakterielle Eigenschaften haben oder die orale Biofilmbildung verzögern, erfordert weitere Untersuchungen.

6 Literaturverzeichnis

1. Absi EG, Addy M, Adams D (1992) Dentine hypersensitivity--the effect of toothbrushing and dietary compounds on dentine in vitro: an SEM study. *J Oral Rehabil* 19:101-110
2. Adams D, Addy M (1994) Mouthrinses. *Adv Dent Res* 8:291-301
3. Addy M (1986) Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. *J Clin Periodontol* 13:957-964
4. Aguerre MJ, Capozzolo MC, Lencioni P, Cabral C, Wattiaux MA (2016) Effect of quebracho-chestnut tannin extracts at 2 dietary crude protein levels on performance, rumen fermentation, and nitrogen partitioning in dairy cows. *J Dairy Sci* 99:4476-4486
5. Akazome Y, Senel S, Ay ZY (2004) Characteristics and physiological functions of polyphenols from apples. *Biofactors* 22:311-314
6. Akncbay H, Senel S, Ay ZY (2007) Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis. *J Biomed Mater Res B* 80:290-296
7. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A (1999) Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *J Dent Res* 78:1821-1828
8. Attin T, Becker K, Hannig C, Buchalla W, Hilgers R (2005a) Method to detect minimal amounts of calcium dissolved in acidic solutions. *Caries Res* 39:432-436
9. Attin T, Becker K, Hannig C, Buchalla W, Wiegand A (2005b) Suitability of a malachite green procedure to detect minimal amounts of phosphate dissolved in acidic solutions. *Clin Oral Investig* 9:203-207
10. Bajec MR, Pickering GJ (2008) Astringency: mechanisms and perception. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48:858-875
11. Barbour ME, Shellis RP, Parker DM, Allen GC, Addy M (2008) Inhibition of hydroxyapatite dissolution by whole casein: the effects of pH, protein concentration, calcium, and ionic strength. *Eur J Oral Sci* 116:473-478
12. Bee G, Silacci P, Ampuero-Kragten S, Candek-Potokar M, Wealleans AL, Litten-Brown J, Salminen JP, Mueller-Harvey I (2016) Hydrolysable tannin-based diet rich in gallotannins has a minimal impact on pig performance but significantly reduces salivary and bulbourethral gland size. *Animal* 11:1617-1625

13. Berg IC, Rutland MW, Arnebrant T (2003) Lubricating properties of the initial salivary pellicle--an AFM study. *Biofouling* 19:365-369
14. Bhaskara Reddy MV, Arul J, Angers P, Couture L (1999) Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *J Agric Food Chem* 47:1208-1216
15. Bhattacharya S, Virani S, Zavro M, Haas GJ (2003) Inhibition of *Streptococcus mutans* and other oral Streptococci by hop (*Humulus lupulus* L.) constituents. *Economic Botany* 57:118-125
16. Brex M, Theilade J, Attstrom R (1983) An ultrastructural quantitative study of the significance of microbial multiplication during early dental plaque growth. *J Periodontal Res* 18:177-186
17. Brex M (1997) Strategies and agents in supragingival chemical plaque control. *Periodontol* 2000 15:100-108
18. Bumgardner JD, Wisner R, Elder SH, Jouett R, Yang Y, Ong JL (2003) Contact angle, protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to chitosan coatings bonded to titanium. *J Biomater Sci Polym Ed* 14:1401-1409
19. Busscher HJ, Engels E, Dijkstra RJ, van der Mei HC (2008) Influence of a chitosan on oral bacterial adhesion and growth in vitro. *Eur J Oral Sci* 116:493-495
20. Cassels BK, Asencio M, Conget P, Speisky H, Videla LA, Lissi EA (1995) Structure-antioxidative activity relationships in benzyloquinoline alkaloids. *Pharmacol Res* 31:103-107
21. Chang CH, Chiu HF, Han YC, Chen IH, Shen YC, Venkatakrishnan K, Wang CK (2017) Photoprotective effects of cranberry juice and its various fractions against blue light-induced impairment in human retinal pigment epithelial cells. *Pharm Biol* 55:571-580
22. Cheaib Z, Lussi A (2011) Impact of acquired enamel pellicle modification on initial dental erosion. *Caries Res* 45:107-112
23. Chitme HR, Chandra M, Kaushik S (2004) Studies on anti-diarrhoeal activity of *Calotropis gigantea* R.Br. in experimental animals. *J Pharm Pharm Sci* 7:70-75
24. Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y (1998) Tannins and human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38:421-464

25. Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JC, Lin JG (2004) Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin* 25:932-936
26. Cooksey K (2005) Effectiveness of antimicrobial food packaging materials. *Food Addit Contam* 22:980-987
27. Costerton JW (1995) Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 15:137-140
28. Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12:564-582
29. Crespy V, Williamson G (2004) A review of the health effects of green tea catechins in vivo animal models. *J Nutr* 134:3431S-3440S
30. Decker EM, von Ohle C, Weiger R, Wiech I, Brex M (2005) A synergistic chlorhexidine/chitosan combination for improved antiplaque strategies. *J Periodontol Res* 40:373-377
31. Delius J, Trautmann S, Médard G, Kuster B, Hannig M, Hofmann T (2017) Label-free quantitative proteome analysis of the surface-bound salivary pellicle. *Colloids Surf B Biointerfaces* 152:68-76
32. Ehlen LA, Marshall TA, Qian F, Wefel JS, Warren JJ (2008) Acidic beverages increase the risk of in vitro tooth erosion. *Nutr Res* 28:299-303
33. Eley BM (1999) Antibacterial agents in the control of supragingival plaque--a review. *Br Dent J* 186:286-296
34. Eweis M, Elkholy SS, Elsabee MZ (2006) Antifungal efficacy of chitosan and its thiourea derivatives upon the growth of some sugar-beet pathogens. *Int J Biol Macromol* 38:1-8
35. Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A (2007) Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Arch Oral Biol* 52:1048-1056
36. Hannig C, Spitzmuller B, Al-Ahmad A, Hannig M (2008) Effects of Cistus-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the in situ pellicle. *J Dent* 36:540-545
37. Hannig C, Hannig M (2009) The oral cavity--a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig* 13:123-139
38. Hannig C, Sorg J, Spitzmuller B, Hannig M, Al-Ahmad A (2009) Polyphenolic beverages reduce initial bacterial adherence to enamel in situ. *J Dent* 37:560-566

39. Hannig C, Wagenschwanz C, Potschke S, Kummerer K, Kensche A, Hoth-Hannig W, Hannig M (2012) Effect of safflower oil on the protective properties of the in situ formed salivary pellicle. *Caries Res* 46:496-506
40. Hannig C, Gaeding A, Basche S, Richter G, Helbig R, Hannig M (2013) Effect of conventional mouthrinses on initial bioadhesion to enamel and dentin in situ. *Caries Res* 47:150-161
41. Hannig M (1997) Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. *Eur J Oral Sci* 105:422-433
42. Hannig M (1999) Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig* 3:88-95
43. Hannig M, Balz M (1999) Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 33:372-379
44. Hannig M, Hess NJ, Hoth-Hannig W, De Vrese M (2003) Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization--an in situ pilot study. *Clin Oral Investig* 7:158-161
45. Hannig M, Fiebiger M, Guntzer M, Dobert A, Zimehl R, Nekrashevych Y (2004) Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Arch Oral Biol* 49:903-910
46. Hannig M, Khanafer AK, Hoth-Hannig W, Al-Marrawi F, Acil Y (2005) Transmission electron microscopy comparison of methods for collecting in situ formed enamel pellicle. *Clin Oral Investig* 9:30-37
47. Hannig M, Joiner A (2006) The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci* 19:29-64
48. Hannig M, Hannig C (2014) The pellicle and erosion. *Monogr Oral Sci* 25:206-214
49. Hannig M, Hannig, C. (2007) Der initiale orale Biofilm– pathogen oder protektiv? *Oralprophylaxe & Kinderzahnheilkunde* 29:73-82
50. Helander IM, Nurmiaho-Lassila EL, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S (2001) Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol* 71:235-244
51. Hemingway CA, White AJ, Shellis RP, Addy M, Parker DM, Barbour ME (2010) Enamel erosion in dietary acids: inhibition by food proteins in vitro. *Caries Res* 44:525-530

52. Henke A, Dickhoefer U, Westreicher-Kristen E, Knappstein K, Molkentin J, Hasler M, Susenbeth A (2016) Effect of dietary Quebracho tannin extract on feed intake, digestibility, excretion of urinary purine derivatives and milk production in dairy cows. *Arch Anim Nutr* 71:37-53
53. Hertel S, Potschke S, Basche S, Delius J, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C (2017) Effect of Tannic Acid on the Protective Properties of the in situ Formed Pellicle. *Caries Res* 51:34-45
54. Hsieh CY, Tsai SP, Wang DM, Chang YN, Hsieh HJ (2005) Preparation of gamma-PGA/chitosan composite tissue engineering matrices. *Biomaterials* 26:5617-5623
55. Inaba H, Tagashira M, Kanda T, Ohno T, Kawai S, Amano A (2005) Apple- and hop-polyphenols protect periodontal ligament cells stimulated with enamel matrix derivative from *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 76:2223-2229
56. Inaba H, Tagashira M, Honma D, Kanda T, Kou Y, Ohtake Y, Amano A (2008) Identification of hop polyphenolic components which inhibit prostaglandin E2 production by gingival epithelial cells stimulated with periodontal pathogen. *Biol Pharm Bull* 31:527-530
57. Jaeggi T, Lussi A (2014) Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral Sci* 25:55-73
58. Jardim JJ, Alves LS, Maltz M (2009) The history and global market of oral home-care products. *Braz Oral Res* 23 Suppl 1:17-22
59. Jarvinen V, Meurman JH, Hyvarinen H, Rytomaa I, Murtomaa H (1988) Dental erosion and upper gastrointestinal disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 65:298-303
60. Jarvinen VK, Rytomaa, II, Heinonen OP (1991) Risk factors in dental erosion. *J Dent Res* 70:942-947
61. Joiner A, Muller D, Elofsson UM, Malmsten M, Arnebrant T (2003) Adsorption from black tea and red wine onto in vitro salivary pellicles studied by ellipsometry. *Eur J Oral Sci* 111:417-422
62. Joiner A, Muller D, Elofsson UM, Arnebrant T (2004) Ellipsometry analysis of the in vitro adsorption of tea polyphenols onto salivary pellicles. *Eur J Oral Sci* 112:510-515
63. Joiner A, Elofsson UM, Arnebrant T (2006) Adsorption of chlorhexidine and black tea onto in vitro salivary pellicles, as studied by ellipsometry. *Eur J Oral Sci* 114:337-342

64. Joiner A, Schwarz A, Philpotts CJ, Cox TF, Huber K, Hannig M (2008) The protective nature of pellicle towards toothpaste abrasion on enamel and dentine. *J Dent* 36:360-368
65. Jones CG (1997) Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol* 2000 15:55-62
66. Jung DJ, Al-Ahmad A, Follo M, Spitzmuller B, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C (2010) Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel in situ. *J Microbiol Methods* 81:166-174
67. K. Raisch SR (2005) Validation of a quantitative fat binding assay for polyglucosamin (L112). Nutrition, Geneva
68. Kalembe D, Kunicka A (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem* 10:813-829
69. Kensche A, Reich M, Kummerer K, Hannig M, Hannig C (2013) Lipids in preventive dentistry. *Clin Oral Investig* 17:669-685
70. Kensche A, Holder C, Basche S, Tahan N, Hannig C, Hannig M (2017) Efficacy of a mouthrinse based on hydroxyapatite to reduce initial bacterial colonisation in situ. *Arch Oral Biol* 80:18-26
71. Kim HS (2005) Do not put too much value on conventional medicines. *J Ethnopharmacology* 100:37-39
72. Kittur FS, Vishu Kumar AB, Varadaraj MC, Tharanathan RN (2005) Chitooligosaccharides--preparation with the aid of pectinase isozyme from *Aspergillus niger* and their antibacterial activity. *Carbohydr Res* 340:1239-1245
73. Krahwinkel T, Willershausen B (2000) The effect of sugar-free green tea chew candies on the degree of inflammation of the gingiva. *Eur J Med Res* 5:463-467
74. Kratz F, Grass S, Umanskaya N, Scheibe C, Müller-Renno C, Davoudi N (2015) Cleaning of biomaterial surfaces: Protein removal by different solvents. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 128: 28-35
75. Kurumatani M, Fujita R, Tagashira M, Shoji TK, T., Ikeda MS, A., Yanagida A, Shibusawa Y, Shindo H, Ito Y (2005) Analysis of polyphenols from hop bract region using CCC. *J Liquid Chromatography & Related Technologies* 28:1971-1983
76. Luck P, Vårum KM, Foegeding EA (2015) Charge related astringency of chitosans. *Food Hydrocolloids* 48:174-178

77. Lussi A, Schaffner M (2000) Progression of and risk factors for dental erosion and wedge-shaped defects over a 6-year period. *Caries Res* 34:182-187
78. Lussi A, Jaeggi T, Schaffner M (2002) Diet and dental erosion. *Nutrition* 18:780-781
79. Lussi A, Jaeggi T, Zero D (2004) The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res* 1:34-44
80. Lussi A (2006) Erosive tooth wear - a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. *Monogr Oral Sci* 20:1-8
81. Lussi A, Carvalho TS (2014) Erosive tooth wear: a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. *Monogr Oral Sci* 25:1-15
82. Marsh PD, Bradshaw DJ (1995) Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 15:169-175
83. Marsh PD (1999) Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am* 43:599-614, v-vi
84. Marsh PD (2005) Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. *J Clin Periodontol* 6:7-15
85. Maupome G, Aguilar-Avila M, Medrano-Ugalde H, Borges-Yanez A (1999) In vitro quantitative microhardness assessment of enamel with early salivary pellicles after exposure to an eroding cola drink. *Caries Res* 33:140-147
86. McConnell MD, Liu Y, Nowak AP, Pilch S, Masters JG, Composto RJ (2010) Bacterial plaque retention on oral hard materials: effect of surface roughness, surface composition, and physisorbed polycarboxylate. *J Biomed Mater Res A* 92:1518-1527
87. McCracken M, O'Neal SJ (2000) Dental erosion and aspirin headache powders: a clinical report. *J Prosthodont* 9:95-98
88. Meurman JH, Frank RM (1991) Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 25:1-6
89. Moazzez R, Bartlett D (2014) Intrinsic causes of erosion. *Monogr Oral Sci* 25:180-196
90. Moore WE (1994) The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5:66-77
91. Morinaga N, Iwamaru Y, Yahiro K, Tagashira M, Moss J, Noda M (2005) Differential activities of plant polyphenols on the binding and internalization of cholera toxin in vero cells. *J Biol Chem* 280:23303-23309

92. Nakahara K, Kawabata S, Ono H, Ogura K, Tanaka T, Ooshima T, Hamada S (1993) Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glycosyltransferases of mutans *Streptococci*. *Appl Environ Microbiol* 59:968-973
93. Nakamichi I, Iwaku M, Fusayama T (1983) Bovine teeth as possible substitutes in the adhesion test. *J Dent Res* 62:1076-1081
94. Nakatani N (2000) Phenolic antioxidants from herbs and spices. *Biofactors* 13:141-146
95. Netuschil L, Hoffmann T, Brex M (2003) How to select the right mouthrinses in periodontal prevention and therapy. Part I. Test systems and clinical investigations. *Int J Dent Hyg* 1:143-150
96. Ooshima T, Minami T, Aono W, Tamura Y, Hamada S (1994) Reduction of dental plaque deposition in humans by oolong tea extract. *Caries Res* 28:146-149
97. Otake S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M (1991) Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res* 25:438-443
98. Poretti F, Rosen T, Korner B, Vorwerk D (2005) Chitosan pads vs. manual compression to control bleeding sites after transbrachial arterial catheterization in a randomized trial. *Rofo* 177:1260-1266
99. Prabu GR, Gnanamani A, Sadulla S (2006) Guaijaverin -- a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *J Appl Microbiol* 101:487-495
100. Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W (2003) Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4:1457-1465
101. Rasheed A, Haider M (1998) Antibacterial activity of *Camellia sinensis* extracts against dental caries. *Arch Pharm Res* 21:348-352
102. Rehage M, Delius J, Hofmann T, Hannig M (2017) Oral astringent stimuli alter the enamel pellicle's ultrastructure as revealed by electron microscopy. *J Dent* 63:21-29
103. Rodriguez MS, Albertengo, L.A., Vitale, I., Agullo, E. (2003) Relationship between astringency and chitosan-saliva solutions turbidity at different pH. *J Food Sci* 68:665-667
104. Ronstrom A, Edwardsson S, Atstrom R (1977) *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus salivarius* in early plaque formation on plastic films. *J Periodontal Res* 12:331-339
105. Rykke M, Sonju T (1991) Amino acid composition of acquired enamel pellicle collected in vivo after 2 hours and after 24 hours. *Scand J Dent Res* 99:463-469

106. Sakanaka S, Sato T, Kim M, Yamamoto T (1990) Inhibitory effects of green tea polyphenols on glucan synthesis and cellular adherence of cariogenic streptococci. *Agricultural and biological chemistry* 54:2925-2929
107. Sano H, Shibasaki K, Matsukubo T, Takaesu Y (2001) Comparison of the activity of four chitosan derivatives in reducing initial adherence of oral bacteria onto tooth surfaces. *Bull Tokyo Dent Coll* 42:243-249
108. Sarner B, Sundin E, Abdulrahman S, Birkhed D, Lingstrom P (2012) Use of different mouthrinses in an adult Swedish population. *Swed Dent J* 36:53-60
109. Schweizer-Hirt CM, Schait A, Schmid R, Imfeld T, Lutz F, Muhlemann HR (1978) Erosion and abrasion of the dental enamel. Experimental study. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 88:497-529
110. Shani S, Friedman M, Steinberg D (2000) The anticariogenic effect of amine fluorides on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase in biofilms. *Caries Res* 34:260-267
111. Shinada K, Tagashira M, Watanabe H, Sopapornamorn P, Kanayama A, Kanda T, Ikeda M, Kawaguchi Y (2007) Hop bract polyphenols reduced three-day dental plaque regrowth. *J Dent Res* 86:848-851
112. Siqueira WL, Helmerhorst EJ, Zhang W, Salih E, Oppenheim FG (2007a) Acquired enamel pellicle and its potential role in oral diagnostics. *Ann N Y Acad Sci* 1098:504-509
113. Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG (2007b) Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. *J Proteome Res* 6:2152-2160
114. Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE (2012) New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res* 91:1110-1118
115. Sreebny LM (2000) Saliva in health and disease: an appraisal and update. *Int Dent J* 50:140-161
116. Sundaram G, Bartlett D (2001) Preventative measures for bulimic patients with dental erosion. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 9:25-29
117. Tagashira M, Uchiyama K, Yoshimura T, Shirota M, Uemitsu N (1997) Inhibition by hop bract polyphenols of cellular adherence and water-insoluble glucan synthesis of mutans streptococci. *Biosci Biotechnol Biochem* 61:332-335

118. Tanaka Y, Yanagida A, Komeya S, Kawana M, Honma D, Tagashira M, Kanda T, Shibusawa Y Comprehensive separation and structural analyses of polyphenols and related compounds from bracts of hops (*Humulus lupulus* L.). *J Agric Food Chem* 62:2198-2206
119. Tanaka Y, Honma D, Tamura M, Yanagida A, Zhao P, Shoji T, Tagashira M, Shibusawa Y, Kanda T (2012) New chromanone and acylphloroglucinol glycosides from the bracts of hops. *Phytochemistry Letters* 5:514-518
120. Tanaka Y, Yanagida A, Komeya S, Kawana M, Honma D, Tagashira M, Kanda T, Shibusawa Y (2014) Comprehensive separation and structural analyses of polyphenols and related compounds from bracts of hops (*Humulus lupulus* L.). *J Agric Food Chem* 62:2198-2206
121. Tsai GJ, Su WH (1999) Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J Food Prot* 62:239-243
122. Vacca Smith AM, Bowen WH (2000) In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol* 45:277-291
123. van der Mei HC, White DJ, Kamminga-Rasker HJ, Knight J, Baig AA, Smit J, Busscher HJ (2002) Influence of dentifrices and dietary components in saliva on wettability of pellicle-coated enamel in vitro and in vivo. *Eur J Oral Sci* 110:434-438
124. van der Mei HC, White DJ, Atema-Smit J, van de Belt-Gritter E, Busscher HJ (2006) A method to study sustained antimicrobial activity of rinse and dentifrice components on biofilm viability in vivo. *J Clin Periodontol* 33:14-20
125. van der Mei HC, Engels E, de Vries J, Dijkstra RJ, Busscher HJ (2007) Chitosan adsorption to salivary pellicles. *Eur J Oral Sci* 115:303-307
126. van der Mei HC, Engels E, de Vries J, Busscher HJ (2008) Effects of amine fluoride on biofilm growth and salivary pellicles. *Caries Res* 42:19-27
127. Wang C, Li Y, Wang X, Zhang L, Tiantang, Fu B (2012) The enamel microstructures of bovine mandibular incisors. *Anat Rec (Hoboken)* 295:1698-1706
128. Weber MT, Hannig M, Potschke S, Hohne F, Hannig C (2015) Application of plant extracts for the prevention of dental erosion: An in situ/in vitro Study. *Caries Res* 49:477-487
129. Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A, Attin T (2008) Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion/abrasion tests? *J Oral Rehabil* 35:390-394

130. Wegehaupt FJ, Widmer R, Attin T (2010) Is bovine dentine an appropriate substitute in abrasion studies? *Clin Oral Investig* 14:201-205
131. White AJ, Gracia LH, Barbour ME (2011) Inhibition of dental erosion by casein and casein-derived proteins. *Caries Res* 45:13-20
132. Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE (1996) Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol* 50:513-552
133. Wolff MS, Larson C (2009) The cariogenic dental biofilm: good, bad or just something to control? *Braz Oral Res* 1:31-38
134. Zero DT (1996) Etiology of dental erosion--extrinsic factors. *Eur J Oral Sci* 104:162-177

7 Danksagung

Ich danke hauptsächlich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Matthias Hannig für die Bereitstellung des Themas, für seine stetige Bereitschaft zur Diskussion fachlicher Probleme und für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, die mir im experimentellen Teil der Arbeit stets mit Rat geduldig zur Seite gestanden haben, für das freundschaftliche Arbeitsklima und die stets vorhandene Bereitschaft zur Zusammenarbeit. Des Weiteren bin ich Norbert Pütz, Birgit Leis und Belinda König zu Dank verpflichtet, die mir bei der Anfertigung der REM- bzw. TEM- Proben geholfen haben und damit zum Erfolg der Dissertation beigetragen haben.

Besonders danken möchte ich auch meinem Ehemann Kawe Yazdani für die Unterstützung und vielen lieben Worte während der Erarbeitung meiner Dissertation und meiner Familie für ihre stetige Stärkung.

8 Lebenslauf

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

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

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

9 Anhang

9.1 REM Analysen: Proband 2, Spülung mit Wasser

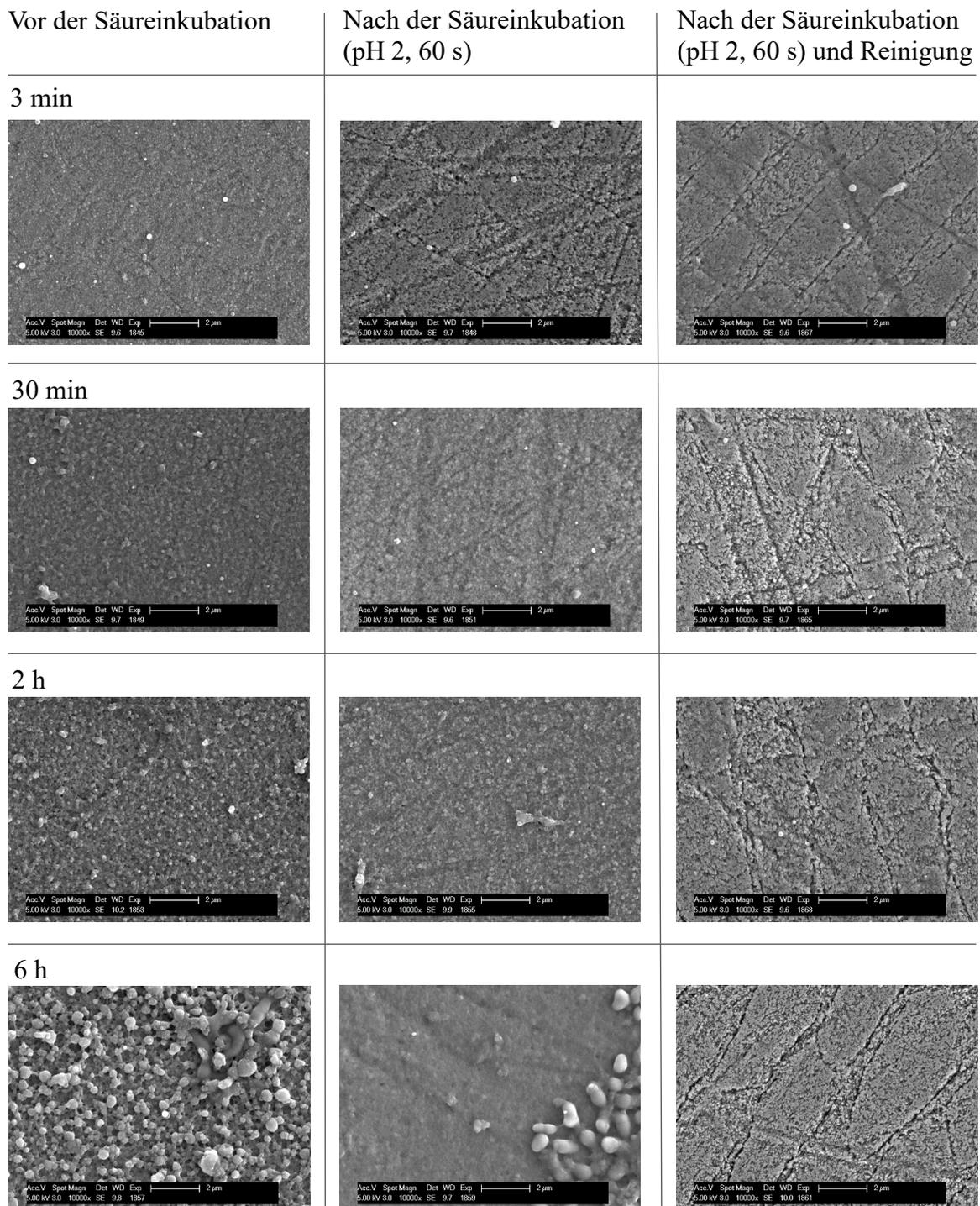


Abb. 29: REM-Aufnahmen (10.000-fache Vergrößerung) der Kontrollpellikel nach Wasserspülung. Die Prüfkörper waren für 3 bzw. 30 min, 2 bzw. 6 h dem intraoralen Milieu ausgesetzt. Nach 3 min intraoraler Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Wasser und die Proben wurden nach unterschiedlichen Tragezeiten entnommen. Die einminütige Ätzung erfolgte mit der Salzsäure nach der intraoralen Exposition in-vitro. Die Reinigung der Prüfkörper erfolgte ebenfalls in-vitro nach der Säureinkubation.

9.2 REM Analysen: Proband 2, Spülung mit Tanninsäure (10 mg/ml)

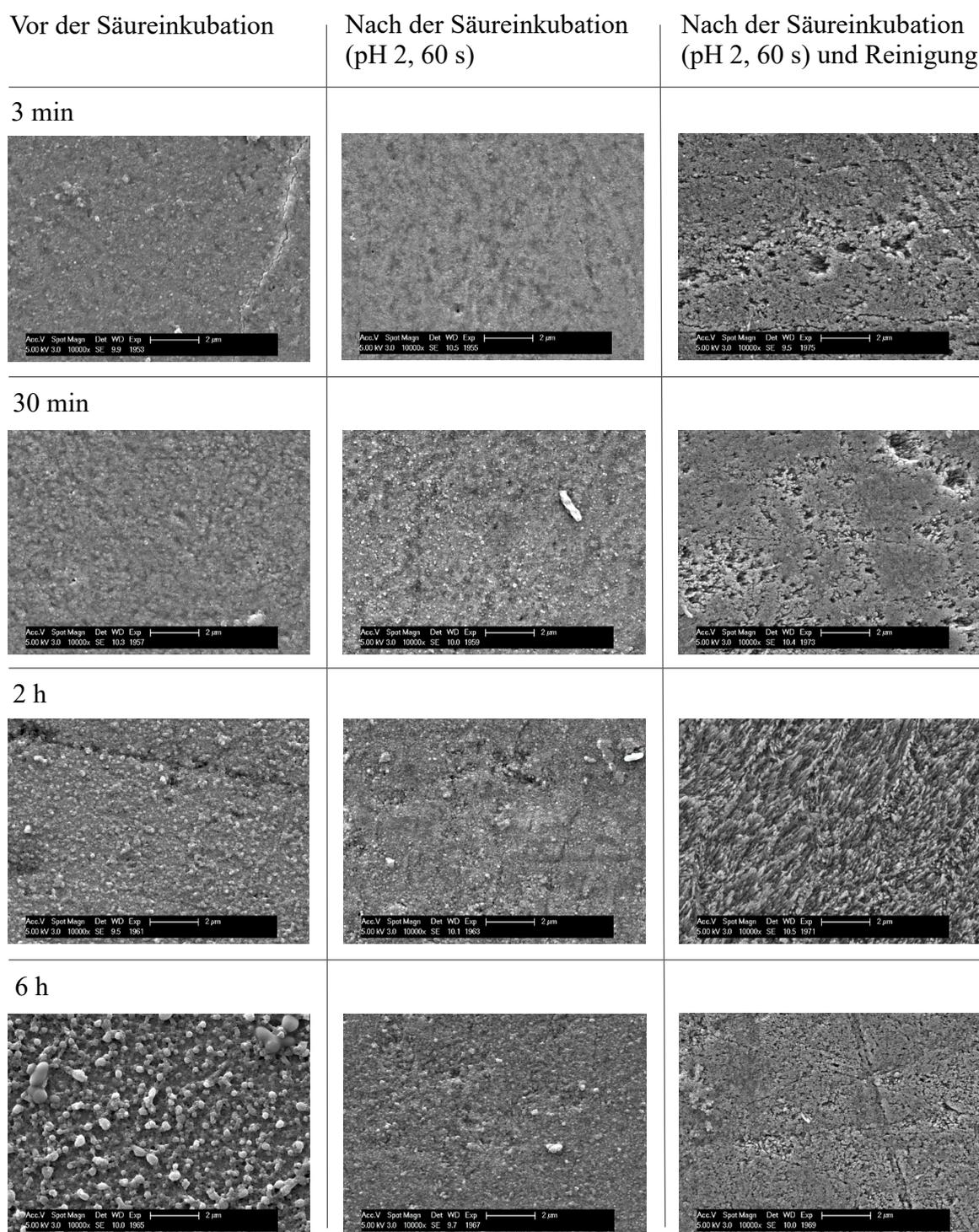


Abb. 30: REM-Aufnahmen (10.000-fache Vergrößerung) der mit Tanninsäure (10 mg/ml) behandelten Pellikel. Die Prüfkörper waren für 3 bzw. 30 min, 2 bzw. 6 h dem intraoralen Milieu ausgesetzt. Nach 3 min intraoraler Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Tanninsäure und die Proben wurden nach unterschiedlichen Tragezeiten entnommen. Die einminütige Ätzung erfolgte mit der Salzsäure nach der intraoralen Exposition in-vitro. Die Reinigung der Prüfkörper erfolgte ebenfalls in-vitro nach der Säureinkubation.

9.3 REM Analysen: Proband 2, Spülung mit Chitosan (5 mg/ml)

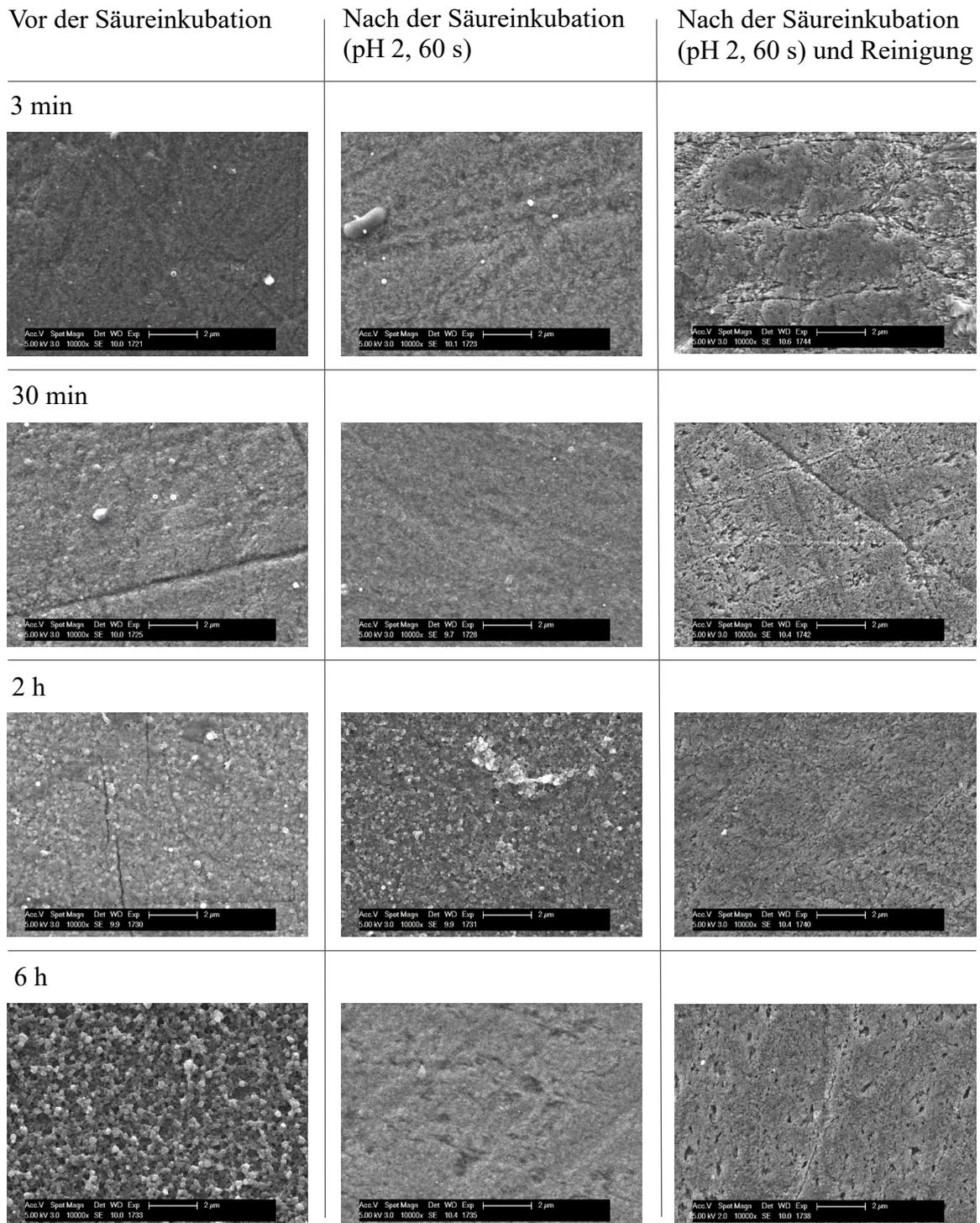


Abb. 31: REM-Aufnahmen (10.000-fache Vergrößerung) der mit Chitosan (5 mg/ml) behandelten Pelikel. Die Prüfkörper waren für 3 bzw. 30 min, 2 bzw. 6 h dem intraoralen Milieu ausgesetzt. Nach 3 min intraoraler Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Chitosan und die Proben wurden nach unterschiedlichen Tragezeiten entnommen. Die einminütige Ätzung erfolgte mit der Salzsäure nach der intraoralen Exposition in-vitro. Die Reinigung der Prüfkörper erfolgte ebenfalls in-vitro nach der Säureinkubation.

9.4 REM-Analysen: Proband 2, Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt

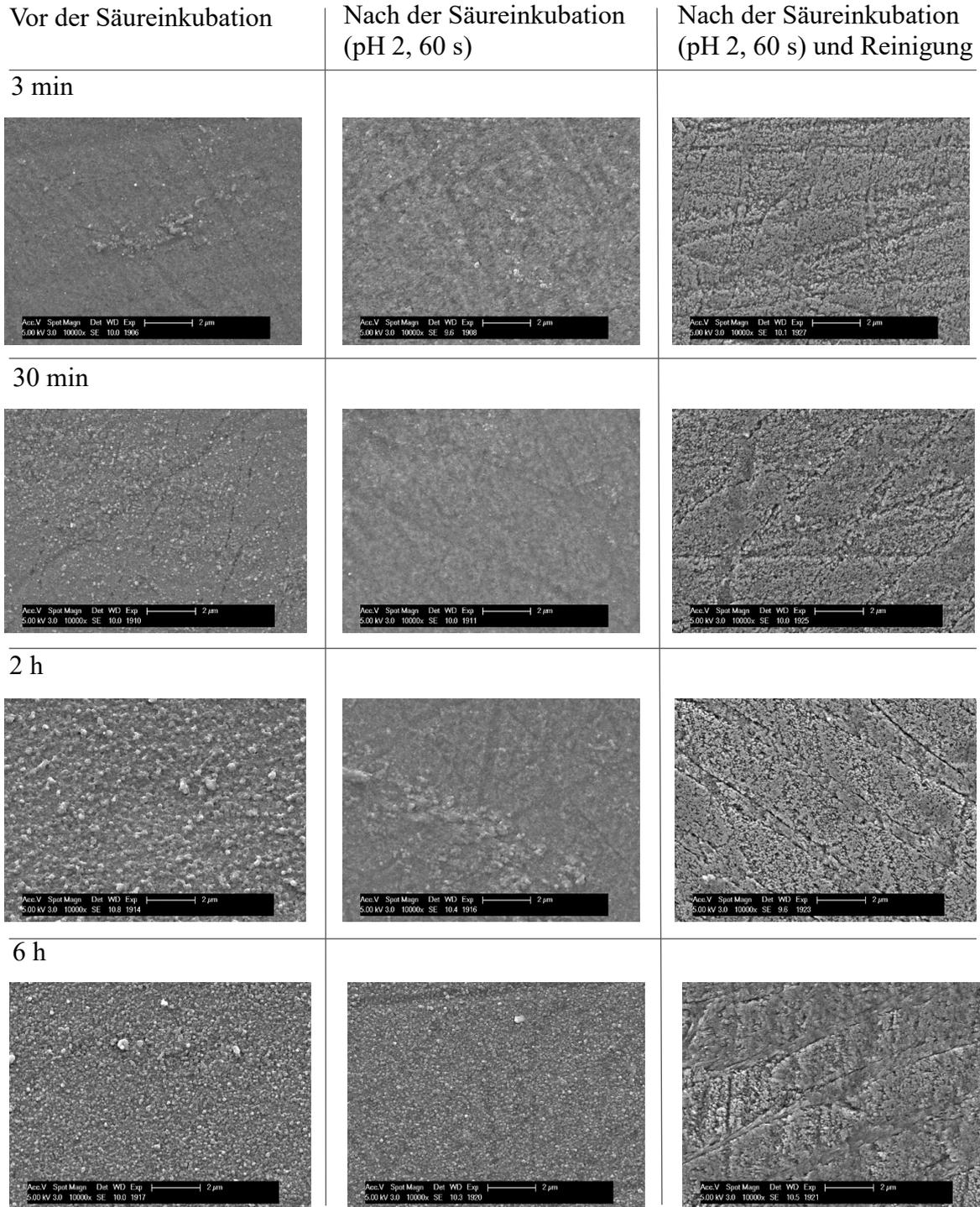


Abb. 32: REM-Aufnahmen (10.000-fache Vergrößerung) der mit experimentellem Hopfenextrakt behandelten Pellicel. Die Prüfkörper waren für 3 bzw. 30 min, 2 bzw. 6 h dem intraoralen Milieu ausgesetzt. Nach 3 min intraoraler Expositionszeit erfolgte die Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt und die Proben wurden nach unterschiedlichen Tragezeiten entnommen. Die einminütige Ätzung erfolgte mit der Salzsäure nach der intraoralen Exposition in-vitro. Die Reinigung der Prüfkörper erfolgte ebenfalls in-vitro nach der Säureinkubation.

9.5 REM-Analysen: Proband 3, Spülung mit Wasser

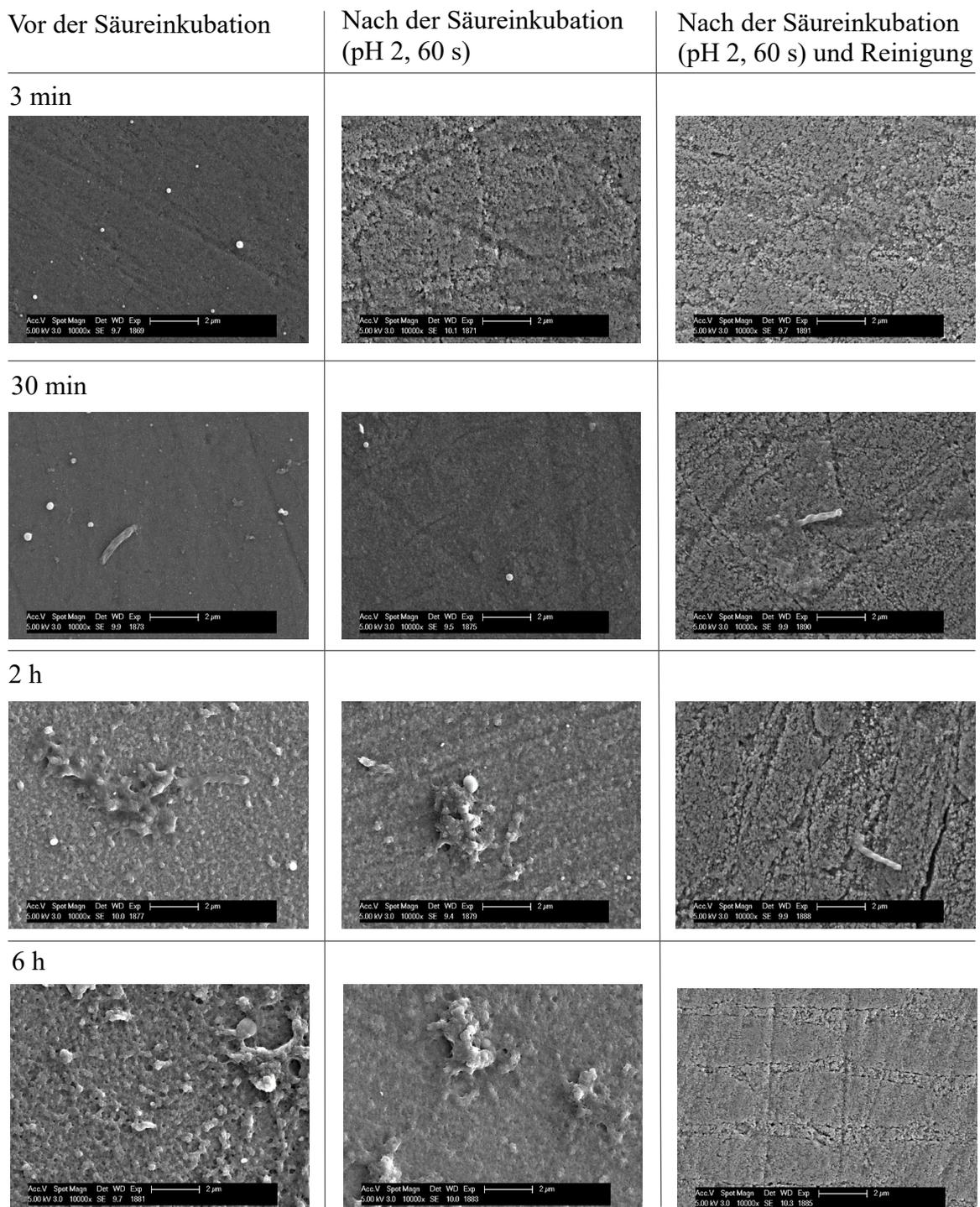


Abb. 33: REM-Aufnahmen (10.000-fache Vergrößerung) der Kontrollpellikel nach Wasserspülung. Die Prüfkörper waren für 3 bzw. 30 min, 2 bzw. 6 h dem intraoralen Milieu ausgesetzt. Nach 3 min intraoraler Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Wasser und die Proben wurden nach unterschiedlichen Tragezeiten entnommen. Die einminütige Ätzung erfolgte mit der Salzsäure nach der intraoralen Exposition in-vitro. Die Reinigung der Prüfkörper erfolgte ebenfalls in-vitro nach der Säureinkubation.

9.6 REM-Analysen: Proband 3, Spülung mit Tanninsäure (10 mg/ml)

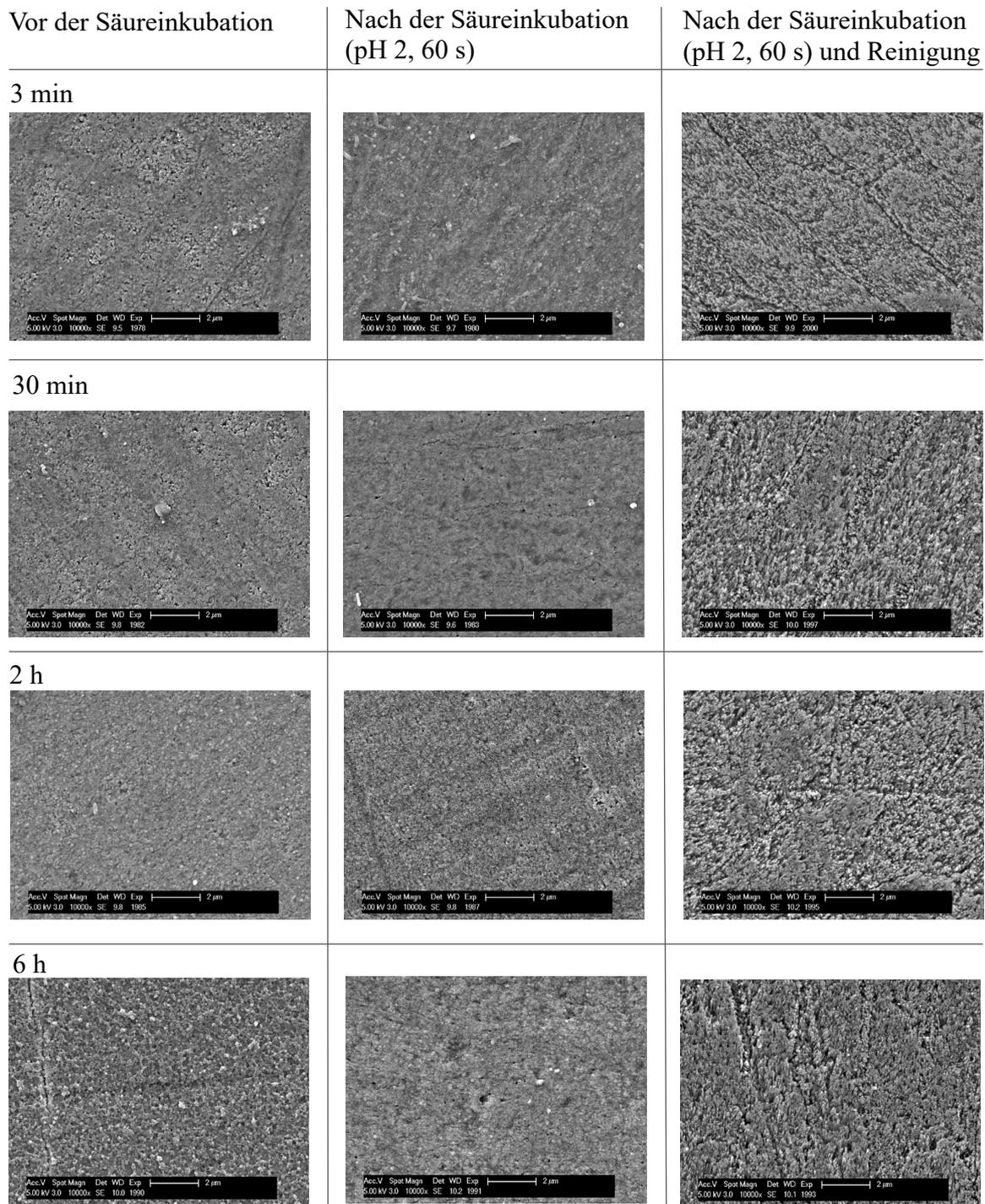


Abb. 34: REM-Aufnahmen (10.000-fache Vergrößerung) der mit Tanninsäure (10 mg/ml) behandelten Pellicel. Die Prüfkörper waren für 3 bzw. 30 min, 2 bzw. 6 h dem intraoralen Milieu ausgesetzt. Nach 3 min intraoraler Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Tanninsäure und die Proben wurden nach unterschiedlichen Tragezeiten entnommen. Die einminütige Ätzung erfolgte mit der Salzsäure nach der intraoralen Exposition in-vitro. Die Reinigung der Prüfkörper erfolgte ebenfalls in-vitro nach der Säureinkubation.

9.7 REM-Analysen: Proband 3, Spülung mit Chitosan (5 mg/ml)

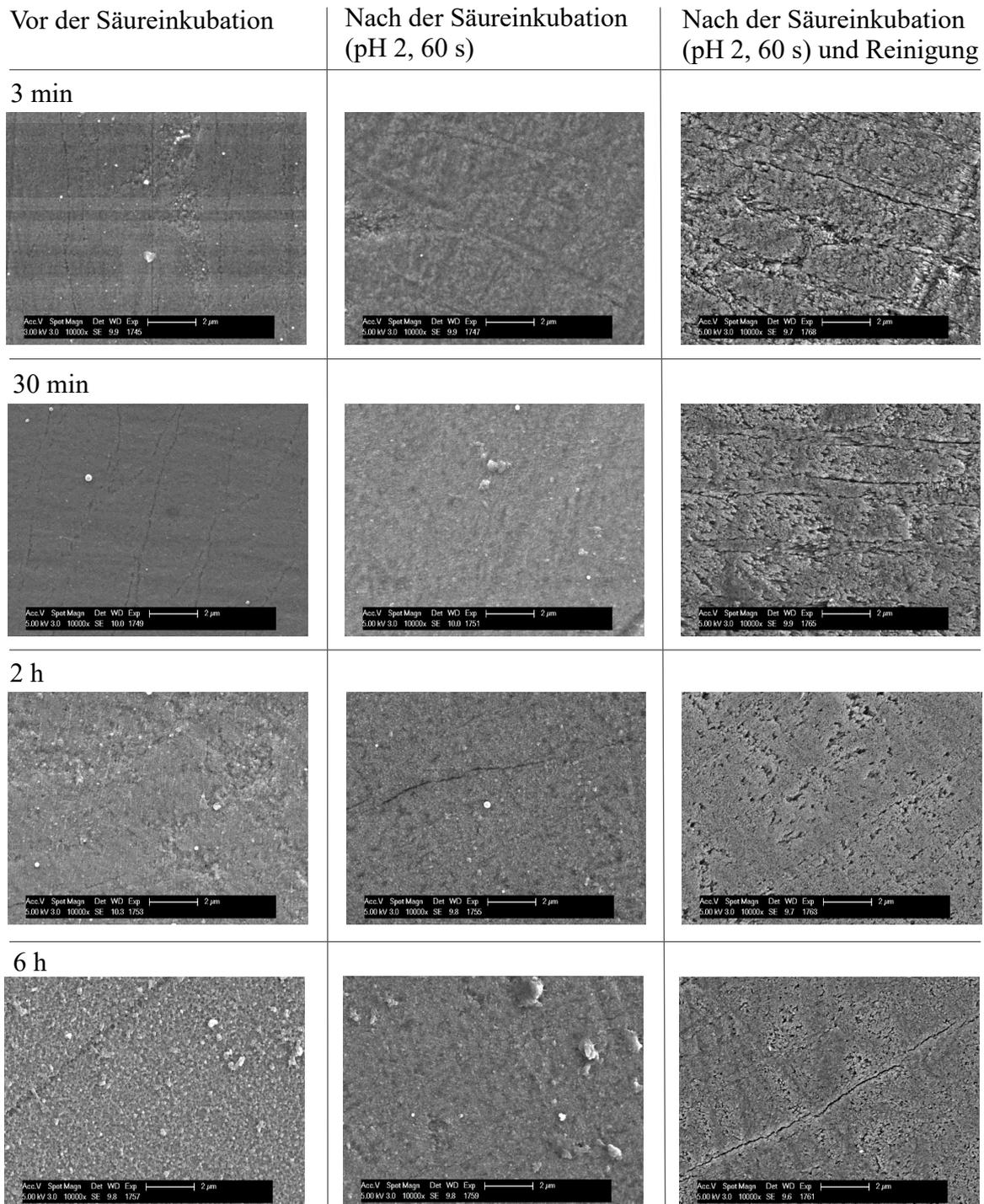


Abb. 35: REM-Aufnahmen (10.000-fache Vergrößerung) der mit Chitosan (5 mg/ml) behandelten Pellikel. Die Prüfkörper waren für 3 bzw. 30 min, 2 bzw. 6 h dem intraoralen Milieu ausgesetzt. Nach 3 min intraoraler Expositionszeit erfolgte die Spülung mit Chitosan und die Proben wurden nach unterschiedlichen Tragezeiten entnommen. Die einminütige Ätzung erfolgte mit der Salzsäure nach der intraoralen Exposition in-vitro. Die Reinigung der Prüfkörper erfolgte ebenfalls in-vitro nach der Säureinkubation.

9.8 REM-Analysen: Proband 3, Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt

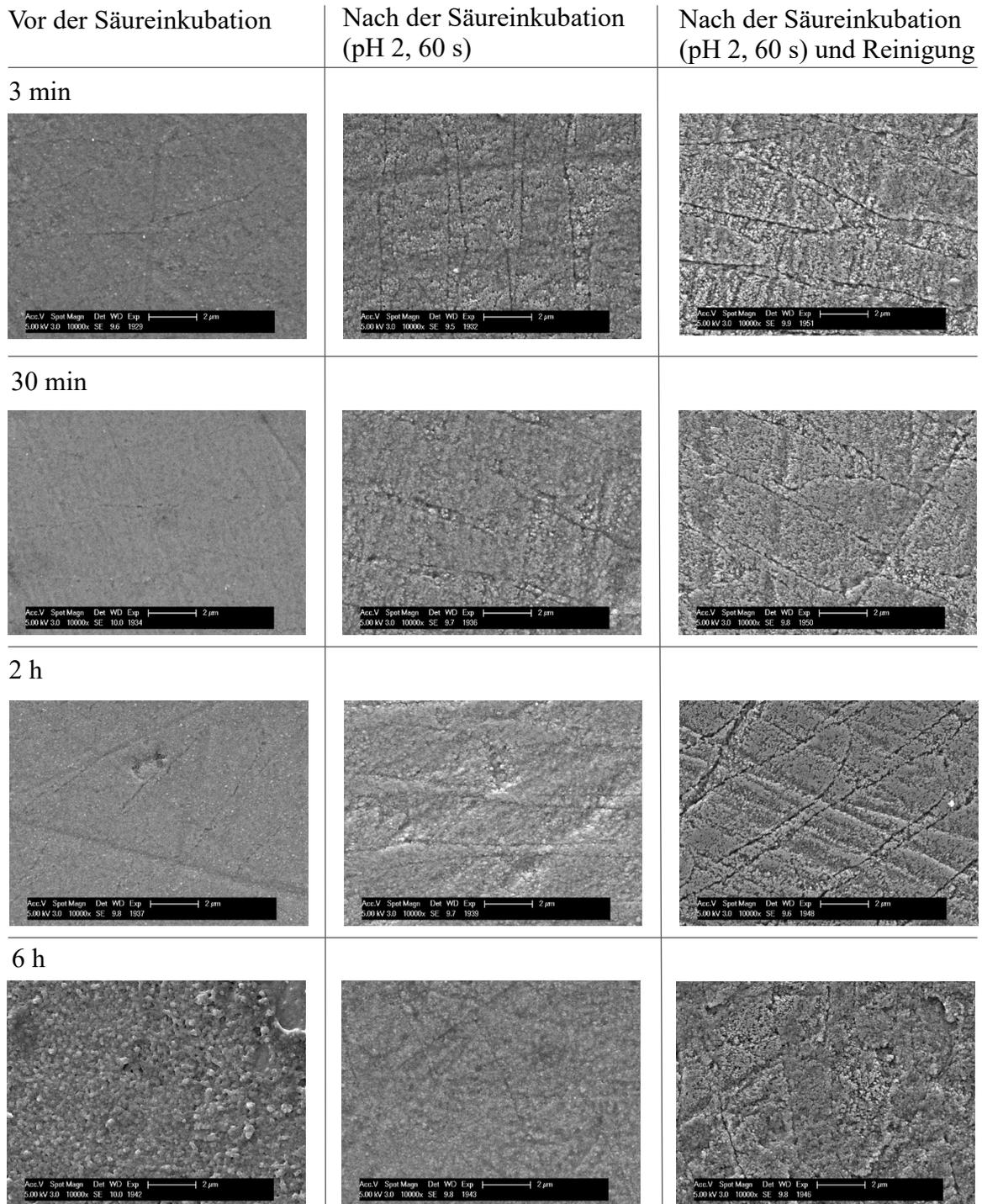


Abb. 36: REM-Aufnahmen (10.000-fache Vergrößerung) der mit experimentellem Hopfenextrakt behandelten Pellikel. Die Prüfkörper waren für 3 bzw. 30 min, 2 bzw. 6 h dem intraoralen Milieu ausgesetzt. Nach 3 min intraoralen Expositionszeit erfolgte die Spülung mit experimentellem Hopfenextrakt und die Proben wurden nach unterschiedlichen Tragezeiten entnommen. Die einminütige Ätzung erfolgte mit der Salzsäure nach der intraoralen Exposition in-vitro. Die Reinigung der Prüfkörper erfolgte ebenfalls in-vitro nach der Säureinkubation.

9.9 Lösungen

Elutionspuffer (immer frisch ansetzen):

a) Triton X-100

70 µl 10 x TRIS-HCl-Puffer mit NaCl

7 µl Triton X-100

140 µl 5 x Proteaseinhibitor ohne EDTA

483 µl H₂O

b) RIPA-Puffer

70 µl 10 x RIPA-Puffer

140 µl 5 x Proteaseinhibitor ohne EDTA

490 µl H₂O

10 x Tris-HCl-NaCl Puffer (4°C)

A) 2,42 g Tris (Tris Pufferan® ≥ 99,5 % p.a., Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)

+ 80 ml Wasser → pH 7,5 mit 37 % HCl

B) 8,7 g NaCl (Carl Roth GmbH+Co, KG, Karlsruhe, Deutschland) + 10 ml Wasser

Lösungen A und B mischen, mit Wasser auf 100 ml auffüllen (0,2 M TRIS, 1,5 M NaCl in 10x Puffer)

Proteaseinhibitor (PI) (-20°C)

1 Tablette PI ohne EDTA (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) in 10 ml Wasser lösen und zu 200 µl aliquotieren.

Elutionspuffer doppelte Konzentration:

a) Triton X-100

70 µl 10 x TRIS-HCl-Puffer mit NaCl

14 µl Triton X-100

140 µl 5 x Proteaseinhibitor ohne EDTA

476 µl H₂O

b) RIPA-Puffer

140 µl 10 x RIPA-Puffer
140 µl 5 x Proteaseinhibitor ohne EDTA
420 µl H₂O

Elutionspuffer zusätzlich mit EDTA:

a) Triton X-100

70 µl 10 x TRIS-HCl-Puffer mit NaCl
7 µl Triton X-100
140 µl 5 x Proteaseinhibitor ohne EDTA
483 µl dH₂O

b) RIPA-Puffer

70 µl 10 x RIPA-Puffer
70 µl 10 x EDTA 137 mM
140 µl 5 x Proteaseinhibitor ohne EDTA
420 µl dH₂O

Elutionspuffer zusätzlich mit einer Ultraschallsonde:

Triton X-100/RIPA-Gemisch

70 µl 10 x TRIS-HCl-Puffer mit NaCl
14 µl Triton X-100
280 µl 5 x Proteaseinhibitor ohne EDTA
140 µl 10 x RIPA-Puffer
896 µl H₂O

Stock-Fixierlösung: 4 % Osmiumsäure (OsO₄)

Die fertige Ampulle, die 1 g Kristall OsO₄ enthält, muss vorher sehr gut entfettet werden und abgespült werden. Osmiumtetroxid wurde zusammen mit der aufgebrochenen Ampulle in der Säureflasche mit 25 ml bidest. Wasser gelöst. Die Säureflasche wurde mit Parafilm luftdicht verschlossen. Die Säureflasche wurde zusätzlich in einem Exsikkator überführt und diese wurde in einem separaten Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Alle Arbeiten wurden unter dem Abzug mit Handschuhen und Schutzbrille durchgeführt.

Arbeitslösung: 2 % Osmiumsäure

Stock-Fixierlösung wurde 1:1 mit 0,2 M Cacodylatpuffer gemischt.

Cacodylatpuffer 0,1 M

21,4 g Natriumcacodylat x 3 H₂O wurde in 250 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Dann wurde diese mit 0,1 M HCl auf einen pH-Wert von 7,4-7,6 gebracht und mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Dies entspricht einer 0,2 M Cacodylatlösung.

Für eine 0,1 M Cacodylatpuffer muss diese Lösung 1:1 mit bidest. Wasser gemischt werden.

Fixierlösung TEM

2 ml Glutaraldehyd (GLA) aus 50 %-iger Lösung (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) wurden mit 3,125 ml Paraformaldehyd (PFA) aus 32 %-iger Lösung (Science Services, München, Deutschland) gemischt und auf 100 ml mit 0,1 M Cacodylatpuffer aufgefüllt.

Fixierlösung REM

4 ml Glutaraldehyd (GLA) aus 50 %-iger Lösung (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)) wurde auf 100 ml mit 0,1 M Cacodylatpuffer aufgefüllt.