

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

Einfluss verschiedener Spüllösungen auf die erosionsprotektiven Eigenschaften der Dentinpellikel

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von:

Wadim Rasputnis

geb. am: 19.11.1992 in Shitomir (Ukraine)

Tag der Promotion: 14. Februar 2022

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hannig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Lisson

Meinem Sohn David in Liebe gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Deutsche Zusammenfassung.....	1
1.2	Abstract.....	2
2	EINLEITUNG	3
2.1	Literaturübersicht.....	3
2.1.1	Pellikel	3
2.1.2	Erosionen	6
2.1.3	Spüllösungen.....	8
2.2	Ziel der Arbeit / Fragestellung.....	12
3	MATERIAL UND METHODE	13
3.1	Probanden	13
3.2	Prüfkörper	13
3.3	Spüllösungen und Erosionsagens.....	16
3.4	Versuchsablauf.....	17
3.5	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	18
3.5.1	Fixierung und Osmierung der Prüfkörper	18
3.5.2	Entwässerung und Einbettung der Prüfkörper	19
3.5.3	Herstellung der Ultradünnschnitte	19
3.5.4	Transmissionselektronenmikroskopie, Bildaufnahme und -analyse.....	19
4	ERGEBNISSE	21
4.1	Versuch I.....	21

4.1.1	Spülung mit sterilem Wasser ohne <i>in-vitro</i> Säureangriff.....	21
4.1.2	Spülung mit sterilem Wasser und <i>in-vitro</i> Säureangriff	26
4.2	Versuch II	30
4.2.1	Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung ohne <i>in-vitro</i> Säureangriff.....	30
4.2.2	Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung und <i>in-vitro</i> Säureangriff.....	35
4.3	Versuch III	38
4.3.1	Spülung mit 1%iger Hopfenlösung ohne <i>in-vitro</i> Säureangriff.....	38
4.3.2	Spülung mit 1%iger Hopfenlösung und <i>in-vitro</i> Säureangriff.....	42
4.4	Versuch IV	45
4.4.1	Spülung mit Elmex Zahnschmelz Professional ohne <i>in-vitro</i> Säureangriff.	45
4.4.2	Spülung mit Elmex Zahnschmelz Professional und <i>in-vitro</i> Säureangriff ..	49
4.5	Schematische Darstellung des Erosionsprozesses	53
5	DISKUSSION	57
5.1	Diskussion der Methodik.....	57
5.1.1	Studiendesign und Probanden.....	57
5.1.2	Prüfkörper	58
5.1.3	Pellikelbildung	59
5.1.4	TEM-Analyse.....	60
5.2	Diskussion der Ergebnisse	61
5.2.1	Diskussion der Pellikelultrastruktur.....	61
5.2.2	Diskussion der Demineralisationszonen	63
5.3	Schlussfolgerungen.....	68
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	69
7	PUBLIKATION / DANKSAGUNG	79

7.1	Publikation	79
7.2	Danksagung	79
8	LEBENS LAUF	80
9	ANHANG	81

Abkürzungsverzeichnis

TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
PK	Prüfkörper
EZP	Elmex Zahnschmelz Professional
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Ziel: Ziel der vorliegenden *In-situ*-Studie war es den Einfluss verschiedener Spüllösungen auf die erosionsprotektiven Eigenschaften der Dentinpellikel zu untersuchen.

Material und Methode: Bovine Dentinprüfkörper wurden auf Kunststoff-Trageschienen montiert und von 3 Probanden getragen. Nach 3-minütiger bzw. 2-stündiger Pellikelbildung *in-situ* spülten die Probanden 30 s mit sterilem Wasser (Negativkontrolle; pH 5,5), Tanninsäurelösung (1%ig; pH 2,9), Hopfenlösung (1%ig; pH 2,4) oder Elmex Zahnschmelz Professional (Positivkontrolle; 500ppm Fluorid, 800ppm Zinn; pH 4,5). Die Hälfte der Prüfkörper wurde 1 min *in-vitro* mit Zitronensäurelösung (1%ig; pH 2,2) erodiert und anschließend alle Prüfkörper für die Transmissionselektronenmikroskopie aufbereitet. Danach wurden die Präparate mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops auf Demineralisation untersucht. Es folgten Längenmessungen der Pellikeldicke und Demineralisationszone, sowie eine Analyse ihrer Struktur.

Ergebnisse: Nach Säureexposition konnten im Dentin Demineralisationszonen dargestellt und Erosionstiefen gemessen werden. Die Erosionstiefen an Prüfkörpern mit einer 2h-Pellikel waren geringer als an Prüfkörpern mit einer 3min-Pellikel. Spülungen mit Tanninsäure- oder Hopfenlösung konnten, im Gegensatz zur Spülung mit Elmex Zahnschmelz Professional, die erosionsprotektiven Eigenschaften der Pellikel nicht erhöhen. Die Spüllösungen und der Säureangriff hinterließen unterschiedliche Demineralisationsmuster, die aufgrund einer randomisierten Verteilung der gelösten Hydroxylapatit-Kristallite entstanden.

Schlussfolgerung: Die kommerziell erhältliche Mundspüllösung Elmex Zahnschmelz Professional ist ein potentiell Präparat für die Prävention von Erosionen am Dentin. Dahingegen zeigten die Tanninsäure- und Hopfenlösung keine erosionsprotektiven Effekte. Der Säureangriff führte bei allen untersuchten Präparaten zur Demineralisation des Dentins, jedoch wiesen die Demineralisationszonen kein einheitliches Muster auf. Die für diese Muster verantwortlichen Prozesse gilt es in Zukunft weiter zu erforschen, um sich einen möglichen Nutzen für die Erosionsprävention und -therapie zu ziehen.

1.2 Abstract

Objectives: The aim of the present *in-situ*-study was to investigate the influence of different experimental mouthrinses on the erosion-protective properties of the dentin pellicle.

Materials und methods: Bovine dentin specimens were attached to buccal surfaces of removable upper jaw splints of three subjects to allow *in-situ* pellicle formation for 3 minutes or 2 hours. After pellicle formation, subjects rinsed for 30 s with sterile water (negative control; pH 5.5), tannic acid solution (1%; pH 2.9), hop solution (1%; pH 2.4) or Elmex Zahnschmelz Professional (positive control; 500 ppm fluoride, 800 ppm stannous; pH 4.5). Half of the specimens were eroded *in-vitro* for 1 min with citric acid (1%; pH 2.2). Then all specimens were processed for transmission electron microscopy and examined for demineralization. This was followed by length measurements of the pellicle thickness and demineralization zone, as well as an analysis of their structure.

Results: After exposure to acid, demineralization zones were observed at the dentin surfaces. The erosion depths were lower after a 2 h pellicle formation time compared to 3 min pellicle formation time. Rinsing with tannic acid or hop solution, in contrast to rinsing with 'Elmex Zahnschmelz Professional', could not enhance the erosion-protective properties of the pellicle. The rinsing solutions led to different demineralization patterns in dentin due to a randomized distribution of the dissolved hydroxyapatite crystallites.

Conclusion: The commercially available mouthrinse 'Elmex Zahnschmelz Professional' is a potential agent to prevent erosion of dentin. In contrast, tannic acid and hop solution showed no erosion-protective effects. The acid attack led to demineralization of dentin in all examined specimens, but the lesions did not show uniform patterns. The processes responsible for these patterns must be researched in the future in order to derive a benefit for erosion prevention and therapy.

2 Einleitung

Die Pellikel ist eine vorwiegend aus Speichelproteinen bestehende, erworbene, bakterienfreie Schicht, die sich auf Oberflächen in der Mundhöhle durch Kontakt mit Speichel bildet [40]. Die Pellikelbildung versteht sich als dynamischer und gleichzeitig selektiver Prozess der Proteinadsorption und -desorption, der nach wenigen Stunden in die Entstehung eines bakteriellen Biofilms mündet [30]. In der Entwicklung dentaler Erosionen fungiert die Pellikel als Mediator. Sie kann u. a. als Diffusionsbarriere während eines Säureangriffs dienen und dadurch den Verlust an Zahnhartsubstanz reduzieren [40]. Erosionen betreffen alle Altersgruppen und gehören in vielen europäischen Ländern zu den häufigsten Gründen für Zahnhartsubstanzverluste. Klinisch manifestieren sich die Schäden meist als verkürzte Zahnkronen oder überempfindliche Dentinflächen [5]. Die hohe Prävalenz von Erosionen [80] und der stetig wachsende Konsum saurer Nahrungsmittel [65] stellt die präventive Zahnheilkunde vor eine große Herausforderung. Modifikationen der Pellikel, beispielsweise durch Mundspülungen mit antierosiven Substanzen, sind ein Ansatz zur Erosionsprävention und -therapie.

2.1 Literaturübersicht

2.1.1 Pellikel

Der anorganische Anteil der Zahnhartsubstanzen Schmelz und Dentin besteht größtenteils aus Hydroxylapatit [15,28]. Hydroxylapatit setzt sich aus Calcium- und Phosphat-Ionen zusammen, die auch im Speichel präsent sind. Je nach Sättigungsverhältnissen im Speichel, können Calcium- und Phosphat-Ionen des Hydroxylapatits in Lösung gehen, auf der Zahnoberfläche präzipitieren oder eine elektrochemische Doppelschicht bilden [40]. An die Ionen-Doppelschicht können durch elektrostatische Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen Proteine aus dem Speichel adsorbieren [33]. Dies geschieht bereits in den ersten Sekunden nach Kontakt mit dem Speichel [36]. Zu den früh adsorbierenden Proteinen zählen die sogenannten Pellikelpräkursoren, wie prolinreiche Proteine, Histatin und Statherin, die alle eine Phosphatgruppe gemein haben [44,62]. Viele weitere Proteine des Speichels binden in den ersten Stunden selektiv an die Pellikel, wie kürzlich durchgeführte Proteom-Analysen ergeben haben [94,110]. Darunter auch Glykoproteine, wie Mucin-

1 (MUC-1) oder Enzyme wie z.B. Amylase und Lysozym [94,110]. Des Weiteren lassen sich auch Kohlenhydrate und Lipide in der Pellikel nachweisen [87,88].

Die initial innerhalb von Minuten gebildete Pellikel stellt sich elektronenmikroskopisch als 10-20 nm dicke Schicht dar, deren Dicke nach zwei Stunden auf bis zu 1000 nm ansteigt. Eine solche 2h-Pellikel zeigt meist einen zweischichtigen Aufbau. Direkt an die Oberfläche der Zahnhartsubstanz grenzt eine nur wenige Nanometer dicke elektronendichte Basisschicht. Hierauf schließt sich dann eine breitere, meist globulär und granulär strukturierte Schicht an [6,36].

Die Pellikel besitzt neben der Eigenschaft als Bindungsstelle für (kariogene) Bakterien [74] auch eine Vielzahl an positiven Eigenschaften. Sie kann beispielsweise als Lubrikant agieren und dadurch sowohl die Abnutzung durch Zahn-Zahn-Kontakt (Attrition) [119], als auch den Abrieb durch andere mechanische Einflüsse (Abrasion) reduzieren [54]. Eine weitere positive Eigenschaft ist die Möglichkeit Fluorid-Ionen einzulagern. Dieses sog. Fluorid-Reservoir kann zu einer Remineralisation durch Freisetzung des Fluorids und Bildung von Fluorapatit führen [98]. Weiterhin haben einige Studien gezeigt, dass die Pellikel vor säureassoziiertem Zahnhartsubstanzverlust schützt [37,39]. In diesem Zusammenhang wird kontrovers diskutiert, ob die Schutzwirkung auch von der Pellikelmaturation bzw. Pellikeldicke abhängig ist [99]. Erwiesen ist bisher, dass die protektiven Eigenschaften mit der Pellikelzusammensetzung korrelieren. Nieuw Amerongen *et al.* (1987) konnten bei *in-vitro*-Versuchen nachweisen, dass Muzine in der Pellikel vor einer Demineralisation schützen können [73]. Ein weiteres erosionsprotektives Protein stellt das Statherin dar, das Calcium in der Pellikel binden kann [61].

Dentinpellikel

Die auf Zahnschmelz gebildete Pellikel ist seit Anbeginn der intraoralen Biofilm-Forschung schwerpunktmäßig untersucht worden. Vergleichsweise dazu wurde die Pellikel auf Dentin (im Folgenden Dentinpellikel genannt) vernachlässigt [54,78]. Gleichwohl nimmt die Bedeutsamkeit der Dentinpellikel zu, da die Prävalenz freiliegender Dentinoberflächen, aufgrund eines längeren Zahnerhaltes in der Bevölkerung und der damit einhergehenden längeren Abnutzungsdauer, steigt. Neben freiliegendem Kronendentin, ist nach gingivalen Rezessionen und Verlust des Wurzelzements, häufig auch Wurzelententin exponiert [12,22,43,45,84].

Erste Untersuchungen zur Dentinpellikel wurden Ende der 1960er Jahre von Per-Olof Glantz durchgeführt [27], einige weitere folgten in den letzten vier Jahrzehnten. Für die Gewinnung der Dentinpellikel wurden sowohl *in-vitro*-, als auch *in-situ*-Modelle genutzt. Hierfür wurden Prüfkörper (PK) aus Dentin in Speichel oder speichelähnliche Substanzen eingelegt (*in-vitro*)

[105,106] oder von Studienteilnehmern intraoral getragen (*in-situ*) [1,54]. Eine bislang noch nicht angewandte *in-vivo*-Methode ist die Verwendung exponierter Dentinflächen nicht extrahierter Zähne. Zur *in-situ*- und *in-vitro*-Pellikelbildung werden neben humanen Dentin-PK häufig auch solche bovinen Ursprungs verwendet. Für einige Untersuchungsmethoden muss die Pellikel von der PK-Oberfläche abgewonnen werden. Dazu wurden in der Vergangenheit sowohl chemische Methoden wie das Aufbringen von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) [60], als auch mechanische Methoden wie die Verwendung von Ultraschall, angewandt [108].

Frühe Arbeiten untersuchten die elementare Zusammensetzung der Dentinpellikel und fanden Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Calcium, Phosphat und Sulfat darin [1]. Danach wurden hauptsächlich spezifische Proteine in der Dentinpellikel und das Proteom der Dentinpellikel analysiert. Beispielsweise konnten Albumin, Lysozym und Amylase in der Dentinpellikel nachgewiesen werden. Hierbei konnte herausgearbeitet werden, dass die beiden letztgenannten Enzyme in der Pellikel auch in ihrer aktiven Form vorliegen und deshalb möglicherweise adhärenente Bakterien oder die Pellikel durchdringende Substanzen beeinflussen können [31,60]. Wiegand *et al.* (2019) haben den Proteingehalt der Dentinpellikel bestimmt. Hierbei lag der durchschnittliche Proteingehalt männlicher Probanden bei 126,7 ng/mm² und weiblicher Probanden bei 144,9 ng/mm² [108]. Proteom-Analysen wurden von Arbeitsgruppen um Taísa Ribas Delecrode durchgeführt. Dabei wurde nicht nur das Dentinpellikel-Proteom bestimmt, sondern auch säureresistente Pellikelproteine identifiziert. Insgesamt konnten in der Dentinpellikel bis zu 66 Proteine nachgewiesen werden, von denen sich bestimmte Muzin-Isoformen, *uncharacterized protein KIAA09* und *Pleckstrin homology domain-containing family A member 4* als besonders säureresistent erwiesen haben [16].

Die Ultrastruktur der Dentinpellikel unterscheidet sich nur geringfügig von derjenigen der Schmelzpellikel. Sie besteht ebenfalls aus einer 30-60 nm dicken elektronendichten Basisschicht, der eine breitere globulär strukturierte Schicht aufliegt [32]. Nach sechs Stunden erreicht die bukkal gebildete Dentinpellikel eine Dicke von insgesamt 1000 nm, palatinal aufgrund einer anderen Speichelzusammensetzung und Scherkräften der Zunge nur 200 nm [6]. Bakterien kommen gehäuft in der maturierten Pellikel vor, und ballen sich dann prädominant im Bereich der Tubuluseingänge. Ferner lassen sich die Pellikel und Bakterien auch in den Dentintubuli nachweisen [35,55].

Im Fokus vieler Untersuchungen zur Dentinpellikel stehen die erosionsprotektiven Eigenschaften [78]. Hinsichtlich der Calciumfreisetzung bei einem Säureangriff mit Salzsäure (pH 2,3) konnten Hannig *et al.* (2007) eine verminderte Freisetzung bei pellikelbeschichteten PK im

Vergleich zu unbeschichteten PK herausarbeiten. Trotzdem stellten sich bei transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen für beide Arten der PK ähnliche Erosionstiefen dar. Diese Versuche wurden mit einer etablierten Methode zur *in-situ*-Pellikelbildung (ähnlich zur Methodik dieser Studie) durchgeführt [32]. Die *in-vitro* gebildete Dentinpellikel ist bei einem Säureangriff weniger protektiv als die *in-situ* erworbene Dentinpellikel, wie vergleichende Untersuchungen zeigen konnten [29]. Einige Arbeitsgruppen haben jedoch keinen säureprotektiven Effekt der Dentinpellikel nachweisen können [11,42,106]. Dies lässt sich mit der Art der Pellikelgewinnung oder auch mit differenten Untersuchungsmethoden, die im nächsten Abschnitt erläutert werden, begründen [83]. Letztlich erwies sich die Dentinpellikel aber in Anbetracht aller Studien häufiger erosionsprotektiv, als nicht erosionsprotektiv [78].

2.1.2 Erosionen

Die dentale Erosion ist der säureinduzierte Verlust von Zahnhartsubstanz durch chemische Prozesse ohne Beteiligung von Bakterien. Sie kann durch Einwirkung intrinsischer oder extrinsischer Säuren initiiert werden, die zur Demineralisation von Schmelz- oder Dentinoberflächen führt. Zu den intrinsischen Säuren gehören körpereigene Flüssigkeiten, wie z.B. der Magensaft, der durch gastroösophagealen Reflux wieder in die Mundhöhle gelangen kann. Einwirkende extrinsische Säuren ergeben sich aus der Aufnahme säurehaltiger Nahrungsmittel [51]. Je nach Säuretyp und Einwirkzeit können Zahnschmelz und Dentin bis zu einer Tiefe von mehreren Mikrometern demineralisiert werden, was folglich zu dessen Erweichung führt [104]. Eine darauffolgende Reibung antagonistischer Zähne oder das Zähneputzen können zu weiteren Substanzverlusten führen. Dieses multifaktorielle Geschehen erschwert den klinischen Nachweis reiner Erosionsdefekte [51]. Erosionen treten meist als matte, abgerundete Kavitäten in Erscheinung. Fortgeschrittene Läsionen sind bedingt durch das durchscheinende oder schon freiliegende Dentin gelblich bis bräunlich [66]. Patienten nehmen die Erosionen meist erst bei klinisch sichtbaren Defekten mit einhergehenden Hypersensibilitäten wahr.

Die Prävalenz erosionsbedingter Zahnhartsubstanzdefekte ist aufgrund des steigenden Konsums saurer Nahrungsmittel hoch [80]. Dabei ist das erosive Potential der Nahrungsmittel von folgenden Faktoren abhängig: pH-Wert, Pufferkapazität, chelatorische Eigenschaften, Calcium-, Phosphat- und Fluoridkonzentration und der Adhäsionskraft zur Zahnoberfläche. Des Weiteren bestimmen die Häufigkeit des Konsums saurer Nahrungsmittel sowie die Art der Nahrungsaufnahme einschließlich der Kontaktzeit zur Zahnoberfläche die Ausprägung der Erosionsschäden. Als wichtigste Maßnahme zur Verhinderung von Erosionen ist die Reduzierung

der Säureexpositionsfrequenz anzusehen [118]. Gleichzeitig gibt es eine Reihe von Mundhygieneprodukten, u. a. auf Basis von Fluorid- und Zinnverbindungen, die zu einer Modifikation der Pellikel führen und dadurch sowohl Schmelz als auch Dentin eine erhöhte Resistenz gegenüber Säuren verleihen [2,114,115]. Polyphenolhaltige Pflanzenextrakte waren in der Vergangenheit ebenfalls im Fokus der Erforschung möglicher Modifikationen zur Steigerung der Erosionsprotektivität der Pellikel. Die positive Wirkung konnte beispielsweise durch Mundspülungen mit Extrakten der Blätter der wilden schwarzen Johannisbeere und wildem Oregano belegt werden. Dazu wurden Schmelz-PK zur *in-situ*-Pellikelbildung getragen und anschließend mit Spüllösungen, hergestellt aus oben genannten Extrakten, gespült. Nach *In-vitro*-Inkubation der PK in Salzsäure wurde die Calcium- und Phosphat-Freisetzung photometrisch gemessen. Hierfür wurde die Reaktion zwischen Calcium und Arsenazo III bzw. Phosphat und Malachitgrün ausgenutzt. Pellikelbehaftete PK ohne Modifikation führten stets zu kleineren Werten hinsichtlich der Calcium- und Phosphatfreisetzung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Pellikel. Die Modifikation der Pellikel mit den Spüllösungen führte zu noch höherer Säureresistenz, wobei insbesondere die Spülung mit der Kombination aus wilder schwarzer Johannisbeere und wildem Oregano den besten Schutz vor Demineralisation geboten hat [102].

Ebenfalls wurden Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Öle auf die Pellikel und ihre erosionsprotektiven Eigenschaften durchgeführt. Hierzu konnten Ionta *et al.* (2018) einen positiven Einfluss durch Palmöl nachweisen [52]. Vergleichsweise dazu zeigte die Anwendung von 100%igem Olivenöl keine Verbesserung der erosionsprotektiven Eigenschaften [107], die Spülung mit Distelöl führte sogar zu einer Reduktion der erosionsprotektiven Eigenschaften der Pellikel. Dies könnte u. a. am niedrigen Polyphenolgehalts des Distelöls oder seiner schwachen Affinität zur Pellikel liegen [34].

In wissenschaftlichen Untersuchungen werden zur Imitation extrinsischer Säuren häufig Zitronensäurelösungen verwendet. Intrinsische Säureangriffe werden meist mittels der molekular kleineren Salzsäure nachgeahmt [49]. Zur Messung der Erosion haben sich verschiedenste Methoden, sowohl qualitativer als auch quantitativer Art, etabliert. Zu den quantitativen Methoden gehören u. a. die Messung der Calciumfreisetzung oder Bestimmung der Oberflächenhärte nach Säureangriff. Als qualitative Messmethoden werden meist mikroskopische Analysen durchgeführt. Hierbei ist zu erwähnen, dass bestimmte Methoden wie z.B. das Messen der Calciumfreisetzung besser als Nachweis für leichte Demineralisationen dienen, das Messen des Oberflächenprofils hingegen für schwerere Demineralisationen geeigneter ist [83].

2.1.3 Spüllösungen

Die Möglichkeit der mechanischen Plaquekontrolle ist bei Menschen mit Behinderungen oder alten Menschen mit eingeschränkten motorischen Fähigkeiten nicht immer gegeben. In solchen Fällen kann eine chemische Plaquekontrolle mittels Mundspüllösungen indiziert sein, wenngleich die chemische Plaquekontrolle nicht an die Effektivität der mechanischen Plaquekontrolle herankommt [9]. Neben antibakteriellen Eigenschaften sind auch antierosive Eigenschaften von Mundspüllösungen wünschenswert. Daher stellt die Erforschung potentieller antierosiver Substanzen, die auch in Spüllösungen eingesetzt werden können, einen Schwerpunkt im Bereich der präventiven Zahnheilkunde dar.

Tanninsäure

Tannine sind sekundäre Pflanzenstoffe und gehören der Gruppe der Polyphenole an. Polyphenole sind laut Definition aromatische Verbindungen mit mindestens zwei Hydroxygruppen am aromatischen Bindungssystem. Man unterscheidet zwischen hydrolysierbaren Tanninen, die z.B. zu Glukose oder anderen mehrwertigen Alkoholen hydrolysiert werden können, und kondensierten Tanninen, die bereits polymere Verbindungen aus Flavan-Gruppen sind [56]. Tannine sind in Pflanzen wie z.B. Eichen und Kastanien und in Pflanzengallen weit verbreitet. Kondensierte Formen kommen als Nahrungsmittel häufig in Früchten, Tee, Bier und Wein vor [21]. Sie sind bekannt für Ihre adstringierende Wirkung, die man u.a. beim Weingenuss wahrnimmt [81].

In der Zahnmedizin sind antikariogene Eigenschaften von Polyphenolen bereits vielfach belegt [20]. Einige Proteine, die in der Pellikel vorkommen, haben eine hohe Affinität zu Polyphenolen. Zu diesen Proteinen zählen prolinreiche Proteine, Amylase, Histatin und Cystatin. Aus der Reaktion zwischen diesen Proteinen und den Polyphenolen fallen unlösliche Komplexe in der Pellikel aus. Infolgedessen ist die Pellikel widerstandsfähiger und säureresistenter. Bei transmissionselektronenmikroskopischer Betrachtung erscheint die Pellikel nach einer Polyphenolbehandlung elektronendichter [7,20]. Verschiedene polyphenolhaltige Pflanzenextrakte wurden hinsichtlich ihrer möglichen antierosiven Effekte auf die Pellikel untersucht. Wie oben erwähnt haben Spüllösungen mit Extrakten der wilden schwarzen Johannisbeere und wildem Origanum zur Steigerung der Erosionsprotektivität der Schmelzpellikel geführt [102]. Im Gegensatz dazu konnten Hertel *et al.* (2016) nach 1-minütiger *In-situ*-Pellikelbildung auf Schmelzprüfkörpern, einer Spülung mit *Inula-viscosa*-Tee und anschließender Salzsäure-Behandlung weder

eine Reduktion der Calcium- und Phosphatfreisetzung noch einen säureprotektiven Effekt mittels transmissionselektronenmikroskopischer Analyse feststellen [46].

Tanninsäure ist ein Ester aus Glukose, Gallussäure und 3-Galloylgallussäure und gehört der Gruppe der hydrolysierbaren Tannine an. Sie ist als gesundheitsförderliche Substanz in unterschiedlichen Medizinbereichen Gegenstand der Forschung [56]. Antimikrobielle, antioxidative und antivirale Eigenschaften konnten bereits nachgewiesen werden [59]. Erste Untersuchungen zur Beeinflussung der erosionsprotektiven Eigenschaften der Pellikel mittels Tanninsäure führten Yu *et al.* (1995) durch. Sie bestimmten die durch Säureangriff mit Perchlorsäure freigesetzte Calcium-Menge mit Hilfe eines Atomabsorptionsspektrometers. Allerdings hat vor Behandlung mit der Tanninsäurelösung keine Pellikelbildung stattgefunden. Nichtsdestotrotz führten Behandlungen der Schmelzprüfkörper mit reiner Tanninsäurelösung, und insbesondere die Kombination aus Tanninsäure und Fluorid, zu einer geringeren Calciumfreisetzung im Vergleich zur Kontrolle [113]. Die Modifikation pellikelbehafteter (*in-situ*) Schmelzprüfkörper mit einer Tanninsäurelösung wurde durch Hertel *et al.* (2017) untersucht. Hier kam es ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Calcium- und Phosphatfreisetzung nach Inkubation in Salzsäurelösungen mit drei verschiedenen pH-Werten (pH 2,0; pH 2,3; pH 3,0) im Vergleich zu Prüfkörpern mit einer unbehandelten Pellikel [47]. Ähnliche Untersuchungen mit Dentinprüfkörpern als Substrat wurden noch nicht durchgeführt. Lediglich die Modifikation der Dentinpellikel mittels Grüntee-Extrakten wurde bislang untersucht. Nach einer 12-stündigen Pellikelbildungszeit wurden die palatinal gelegenen Dentinprüfkörper einer Spülung mit Grüntee unterzogen. Dies führte zu einer Reduktion der Demineralisation, induziert durch *in-vitro* Eintauchen in Coca-Cola, im Vergleich zur Kontrollgruppe [57].

Als Nachteil an der Verwendung polyphenolhaltiger Mundspüllösungen ist eine reversible, extrinsische Verfärbung der Zähne anzusehen, die aufgrund von Reaktionen zwischen den anionischen Polyphenolen und Kationen aus Mundpflegeprodukten, die an die Zahnoberfläche adhären, zustande kommen kann [75,101].

Hopfen

Hopfen (*Humulus lupulus*) gehört der Familie der Hanfgewächse an. Seine Blüten lassen sich in weiblich und männlich unterscheiden, wobei zur Weiterverarbeitung meist die weiblichen Blüten verwendet werden [71]. Zanolli *et al.* (2005) haben phytochemische Analysen der Hopfenblüten durchgeführt, die folgende Inhaltsstoffe hervorbrachten: alpha-Säuren und beta-Säuren (meist Humulone und Lupulone, insgesamt 15-25%), Chalkone, kondensierte Tannine (2-4%), ätherische Öle (1%), Phenolsäuren, Flavonoide, Aminosäuren und natürliche östrogene

Substanzen [116]. Sowohl die in der Hopfenblüte enthaltenen kondensierten Tannine, als auch die Flavonoide sind Polyphenole. Deshalb kommt Hopfen als potentielle Substanz mit antika-riogenen bzw. antierosiven Effekten (siehe Abschnitt Tanninsäure für Mechanismen) auf die Pellikel in Frage. Dem alkoholischen Getränk Bier verleihen die alpha- und beta-Säuren sein spezifisches Aroma und den bitteren Geschmack [90]. Auch als Arzneimittel wird Hopfen verwendet und bereits seit vielen Jahrhunderten in der traditionellen Medizin eingesetzt. Wissenschaftlich belegt wurden bislang antioxidative, antimikrobielle und antikanzerogene Wirkungen der Hopfenblütenextrakte [117].

Die Zahnmedizin betreffend wurde in einer Studie der Einfluss von Hopfen auf die oralen Streptokokken *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* und *Streptococcus sanguis* untersucht. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass sämtliche getesteten Hopfen-Bestandteile (beta-Säure, Xanthohumol (Chalkon), tetra-iso-alpha-Säure und alpha-Säure) *in-vitro* antimikrobiell gegen orale Streptokokken wirken [8]. Tagashira *et al.* (1997) konnten *in-vitro* eine Inhibition der zellulären Adhärenz von *Streptococcus mutans* und *Streptococcus sobrinus* durch Polyphenole, die aus Blättern der Hopfenblüte gewonnen wurden, nachweisen. Auch eine Reduktion der Glykosyltransferase-Aktivität konnte nachgewiesen werden. Dies führte bei den Versuchen zu einer verminderten Glukan-Synthese. Eine Korrelation zwischen verminderter Glukan-Synthese und der verminderten zellulären Adhärenz wird von den Autoren vermutet und liegt nahe [89]. Eine *in-vivo*-Studie zum Einfluss von Hopfen auf die Biofilm-Bildung zeigte, dass die durchschnittliche Plaquemenge signifikant reduziert wird, wenn über drei Tage täglich fünf Mal mit einer 0,1%igen Hopfenpolyphenol-Lösung gespült wird. Gleichzeitig war die *Streptococcus-mutans*-Anzahl in der Plaque im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit gefärbtem destilliertem Wasser gespült hat, ebenfalls signifikant niedriger [85].

Im Rahmen einer *in-situ*-Studie wurde die Beeinflussung der erosionsprotektiven Eigenschaften der Pellikel durch eine wässrige Hopfenlösung (pH 4,7) untersucht. Hierbei zeigte eine rasterelektronenmikroskopische Analyse der PK nach *In-situ*-Pellikelbildung (30 min; 2 h; 6 h), Spülung mit der Hopfenlösung und 60-sekündiger Inkubation in Salzsäure eine reduzierte Demineralisation verglichen mit der Kontrollgruppe (Wasser). In einer anderen Studie führte die 4-minütige Behandlung eines pellikalbehafteten (*in-vitro* gebildet mit humanem Speichel) Schmelzprüfkörpers mit Bier des Herstellers Carlsberg trotz seines sauren pH-Wertes (pH 4,2) nicht zu einer Reduktion der Oberflächenhärte [67]. Möglicherweise waren Hopfenbestandteile des Bieres für die erosionsprotektiven Effekte verantwortlich.

Studien zur Modifikation der Dentinpellikel mit Hopfen-Extrakten fehlen bislang gänzlich.

Fluorid- und Zinnverbindungen

Regelmäßiges Zähneputzen mit fluoridhaltiger Zahnpasta ist die am meisten verbreitete Maßnahme zur Kariesprävention. Seit den 1930er Jahren werden Fluoride zur Verhinderung von Karies untersucht. Eine Vielzahl an Studien konnten karieshemmende Wirkungen belegen, so dass dieser positive Effekt unbestritten ist [100]. Man geht bei der topischen Fluoridanwendung insgesamt von mehreren Mechanismen aus, die synergistisch kariespräventiv wirken: Dazu gehören unter anderem die Bildung einer Calciumfluoriddeckschicht (Fluoridreservoir) auf der Zahnoberfläche, die Substitution von Hydroxylapatit durch schwerer löslicheres Fluorapatit und die Hemmung des bakteriellen Stoffwechsels [82]. Die beiden erstgenannten Mechanismen haben vermutlich auch das Potential antierosiv zu wirken. So konnten Hove *et al.* (2008) signifikante erosionsprotektive Effekte auf die *in-situ* gebildete Pellikel nach Anwendung der Fluoridverbindungen Titanfluorid oder Zinnfluorid nachweisen. Die Spülung mit Natriumfluorid hingegen zeigte keine erosionsprotektive Wirkung [50].

Zinnhaltige Agenzien und ihre erosionsprotektiven Einflüsse auf den Schmelz wurden bereits Ende der 1940er Jahre durch van Huysen *et al.* (1948) und Ericsson (1950) untersucht [18,96]. An diese Studien schlossen sich weitere Untersuchungen zu antierosiven Eigenschaften der Zinnverbindungen an, die allesamt positive Effekte nachwiesen [2,18,24,58]. Die Behandlung von Schmelz und Dentin in Versuchen mit Zinnverbindungen führten stets zu einer niedrigeren Löslichkeit des Hydroxylapatits [24,58]. Ganss *et al.* (2010) zeigten im Rahmen einer *in-situ*-Studie mit 24 Probanden signifikant niedrigere Substanzverluste an Schmelz- und Dentinprüfkörpern nach Spülung mit einer zinnchloridhaltigen Spüllösung (Fluorid- und Zinnkonzentration äquivalent zu EZP) und Säureangriff mit 0,05 M Zitronensäure (pH 2,3) im Vergleich zur Kontrollgruppe (ohne Zinn und Fluorid; pH 7) und einer reinen Natriumfluorid-Spüllösung (500 ppm Fluorid) [24]. Auch eine *in-vitro*-Untersuchung an Dentinprüfkörpern ohne Pellikelbildung zeigte eine signifikante Reduktion des oberflächlichen Substanzverlustes nach Behandlung mit Zinnfluorid oder Zinnchlorid [25]. Bei einer vergleichenden Untersuchung stellte sich Zinnfluorid (500 ppm Fluorid) als protektivste Variante neben Natriumfluorid (500 ppm Fluorid), Natriumfluorophosphat (500 ppm Fluorid), Aminfluorid (500 ppm Fluorid) und Zinnchlorid (1563 ppm Zinn) heraus [58].

Matrix-Metalloproteinasen (MMP) spielen im Karies- und Erosionsprozess des Dentins vermutlich eine wichtige Rolle. Sie können zur Degeneration von Dentin führen, indem sie im Dentin enthaltenes Kollagen Typ I hydrolysieren. Ein Angriffspunkt zur Verhinderung von Zahnhartsubstanzverlusten im Dentin ist möglicherweise die Inhibition von MMPs. Die

inhibitorische Wirkung von Chlorhexidin und Grünteextrakten auf MMPs ist bereits wissenschaftlich belegt [68]. Cvíkl *et al.* (2018) konnten eine Inhibition von MMPs auch durch Zinn-Ionen nachweisen [13]. Dies zeigt, dass Zinn möglicherweise auch durch die Beeinflussung von MMPs antierosiv wirkt. Weiterhin führten Behandlungen mit Zinnfluorid und Zinnchlorid nachweislich zur Präzipitation von zinnhaltigen Verbindungen auf Schmelzoberflächen [4,17]. Dies könnte einen weiteren Ansatz für die Erklärung der erosionsprotektiven Wirkung zinnhaltiger Substanzen darstellen.

Zu den karies- und erosionspräventiven Inhaltsstoffen der kommerziell erhältlichen Mundspülung **Elmex Zahnschmelz Professional** (EZP; CP GABA GmbH, Hamburg, Deutschland), gehören Olafluor und Natriumfluorid in einer Gesamtkonzentration von 500 ppm Fluorid, sowie Zinnchlorid in einer Konzentration von 800 ppm Zinn.

2.2 Ziel der Arbeit / Fragestellung

In der Vergangenheit war die Dentinpellikel nur selten Gegenstand der intraoralen Biofilm-Forschung. Die meisten Untersuchungen zur Dentinpellikel beschränken sich auf die erosionsprotektiven Eigenschaften und brachten widersprüchliche Ergebnisse hervor. Dadurch bleibt die Hypothese, dass die Dentinpellikel Schutz vor Säureangriffen gewährt, weiterhin unbestätigt. Ziel dieser Arbeit war es den Erosionsprozess auf pellikelbehaftetem Dentin mittels der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zu untersuchen und zu eruieren, ob die Modifikation der Pellikel mittels Tanninsäure- oder Hopfenlösung zu einer Verbesserung ihrer antierosiven Eigenschaften führt. Als Negativkontrolle diente steriles Wasser und als Positivkontrolle das Präparat Elmex Zahnschmelz Professional, dessen Fluorid- und Zinnbestandteile nachweislich erosionsprotektiv sind.

3 Material und Methode

3.1 Probanden

An der vorliegenden Studie nahmen insgesamt drei Probanden im Alter von 26 bis 30 Jahren teil. Die Probanden (2 weiblich, 1 männlich) waren Nichtraucher und wurden vor Studienbeginn zahnmedizinisch im Hinblick auf kariöse Läsionen und Parodontalerkrankungen untersucht. Im Anschluss an die Untersuchung erfolgte eine Aufklärung über die Studie.

Folgende Kriterien führten zum Ausschluss von der Studie: aktives Rauchen, Vorhandensein kariöser oder parodontaler Läsionen, allgemeinmedizinische Erkrankungen oder Medikamenteneinnahme, die die Speichelfließrate oder -zusammensetzung beeinflussen.

Eine Zustimmung der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (Kenn.-Nr. 238/03, 2016) lag vor Durchführung der Studie vor.

3.2 Prüfkörper

In der vorliegenden Studie wurden Bruch-PK aus Wurzelentin verwendet [6], um unbehandelte Dentinoberflächen untersuchen zu können. Das Vorgehen zur Herstellung dieser PK wird im Folgenden erklärt: Die Wurzeln von bovinen Unterkieferfrontzähnen dienten als Ausgangsmaterial für die Herstellung der Bruch-Präparate. Wurzeln mit dünnen Dentinwänden und großem Pulpencavum wurden aussortiert, da eine ausreichende Dentinstärke für die Prüfkörperherstellung benötigt wurde. Bei geeigneten Wurzeln wurden von koronaler Seite zwei bis drei Scheiben mit einer Dicke von ca. 3 mm abgetrennt (Trennschleifmaschine Woco 50, Conrad GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland). Aus diesen Scheiben wurden durch Drittelung oder Viertelung an eben dieser Trennschleifmaschine wiederum bis zu 4 PK in ihrer Rohfassung gewonnen. Pulparesten, Prädentin, Wurzelzement und Manteldentin wurden an einem Schleifgerät (Phoenix 3000 Variable Speed Grinder-Polisher, Illinois, USA) mit abrasivem Papier in der Körnung 120-400 Grit (Waterproof Silicon Carbide Paper, Struers GmbH, Willich, Deutschland) entfernt. Anschließend wurden die PK in eine rechteckige Form (ca. 3 x 3 mm) zugestrimmt (Abb. 1a) und mit einer Diamantscheibe eine Bruchkerbe in Richtung der ursprünglichen Längsachse der Wurzel (Dynex Brillant 20 x 0,2mm, Renfert, Hilzingen, Deutschland) unter Wasserkühlung reingeschliffen (Abb. 1b). Die Unterkieferfrontzähne, die fertigen PK, sowie alle Zwischenstufen wurden stets in 0,1%iger Thymollösung (Apotheke des

Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg, Deutschland) bei 4 °C gelagert. 24 h vor der *In-situ*-Pellikelbildung wurden die PK gereinigt. Dies geschah nach folgendem Protokoll: Einlegen der PK in ein mit 3%iger NaOCl-Lösung (Natriumhypochlorit-Lösung 3% DAC 500ml, Hedinger, Stuttgart, Deutschland) gefülltes Schälchen; Spülung der PK mit VE-Wasser (Vollentsalztes Wasser); Ultraschallbad in VE-Wasser für 2 min; Einlegen der PK für 15 min in 70%igem Isopropylalkohol. Die ungebrochenen, gereinigten PK-Rohlinge lagerten dann bei 4 °C für 24 h in sterilem Wasser (Ampuwa, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) zur Rehydrierung. Vor Montage der PK auf individuelle Trageschienen, wurden die Rohlinge mit Hilfe von zwei chirurgischen Nadelhaltern nach Mathieu entlang der Bruchkerbe gebrochen. Beide daraus resultierenden Hälften wurden dann als finale PK verwendet (Abb. 1c).

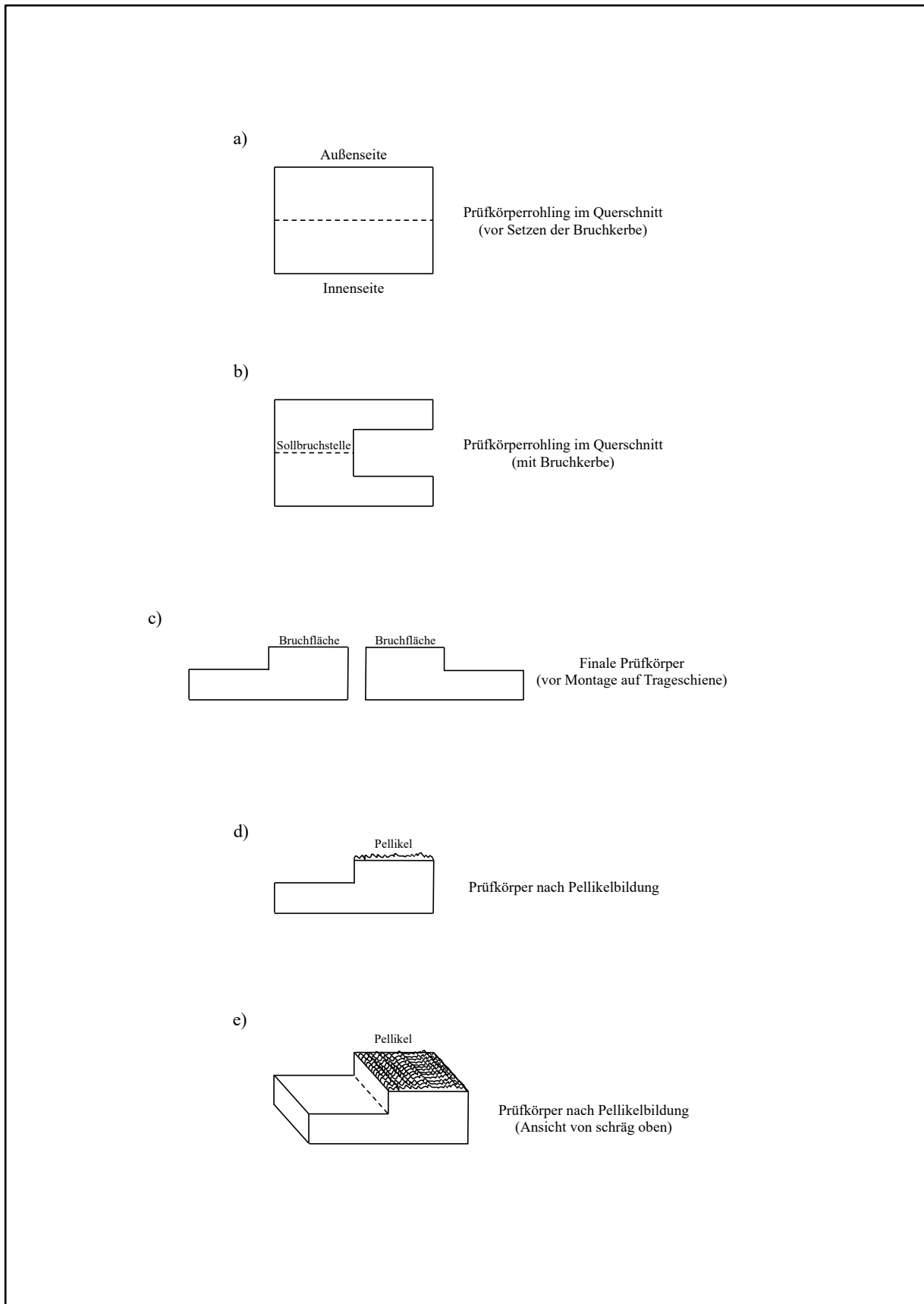


Abb. 1: Prüfkörperskizze. a) Prüfkörper-Rohling vor Setzen der Bruchkerbe b) Prüfkörperrohling mit Bruchkerbe c) Prüfkörper nach dem Brechen d) Prüfkörper nach Pellikelbildung im Querschnitt e) Prüfkörper nach Pellikelbildung (Ansicht von schräg oben)

3.3 Spüllösungen und Erosionsagens

Zur Herstellung der Tanninsäurelösung diente ein hochmolekulares Tanninsäurepulver (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Die **1%ige Tanninsäurelösung** wurde mit 0,1 g des Tanninsäurepulvers angesetzt, welches mit sterilem Wasser auf 10 ml aufgefüllt wurde. Zur besseren Durchmischung wurde ein Reagenzglasschüttler (Model G-560E, Serial #269686, Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA) eingesetzt.

Die **1%ige Hopfenlösung** wurde durch die Firma Flavex, Rehlingen-Siersburg, Deutschland, hergestellt und wurde unverdünnt eingesetzt.

Als Positivkontrolle diente die in der Drogerie verfügbare zinnchlorid- und fluoridhaltige Mundspüllösung **Elmex Zahnschmelz Professional** (CP GABA GmbH, Hamburg, Deutschland), die ebenfalls unverändert eingesetzt wurde.

Die Negativkontrolle erfolgte durch Spülung mit **sterilem Wasser**.

Zur Herstellung der **1%igen Zitronensäurelösung**, die als Erosionsagens diente, wurde Zitronensäure-Monohydrat in Kristallform verwendet. Angesetzt wurde die Zitronensäurelösung mit 0,11 g Zitronensäure-Monohydrat, welches mit sterilem Wasser auf 10 ml aufgefüllt wurde.

Die verwendeten Spüllösungen und das Erosionsagens wurden 24 h vor Versuchsdurchführung angesetzt und in einem 50-ml-Falconröhrchen bei 4 °C gelagert. In Tabelle 1 sind alle Testlösungen mit ihren pH-Werten aufgelistet.

Tabelle 1 pH-Werte der Testlösungen

Testlösung	pH-Wert
Steriles Wasser	5,5
Tanninsäurelösung 1%ig	2,9
Hopfenlösung 1%ig	2,4
Elmex Zahnschmelz Professional	4,5
Zitronensäurelösung 1%ig	2,2

3.4 Versuchsablauf

Je Proband wurden zwei individuelle Trageschienen aus Kunststoff hergestellt, um Dentin-PK im Seitenzahnbereich des 1. und 2. Quadranten zur *In-situ*-Pellikelbildung zu fixieren (Abb. 2). Bevor der finale Dentin-PK mittels dünnfließendem A-Silikon (President light body, Coltène/Whaledent GmbH und Co.KG, Langenau, Deutschland) auf der Schiene montiert werden konnte, wurde diese zur besseren Retention des Silikons bukkal perforiert (Abb. 2). Vor den Tragezeiten wurde eine 2-stündige Nahrungskarenz eingehalten und die Zähne 30 min vor Einsetzen der Schienen ohne Zahnpasta gereinigt. Pellikelbildungszeiten von 3 min und 2 h wurden eingehalten, während auf Mundhygienetätigkeiten und Nahrungskonsum verzichtet wurde.



Abb. 2: Modell mit individueller Trageschiene und montierten Prüfkörpern

Nach erfolgter Pellikelbildung (Abb. 1d und 1e) wurde die Mundhöhle für 30 s mit 10 ml einer der oben beschriebenen Spüllösungen gespült (Abb. 3).

Die PK wurden anschließend mit einer Pinzette von den Schienen entnommen und mittels Wasserstrahl (VE-Wasser) von losen Speichelresten befreit. Ferner wurde jeder zweite PK *ex-situ* mit 5 µl der 1%igen Zitronensäurelösung in einem Fach einer Mikrotiterplatte erodiert (Abb. 3).

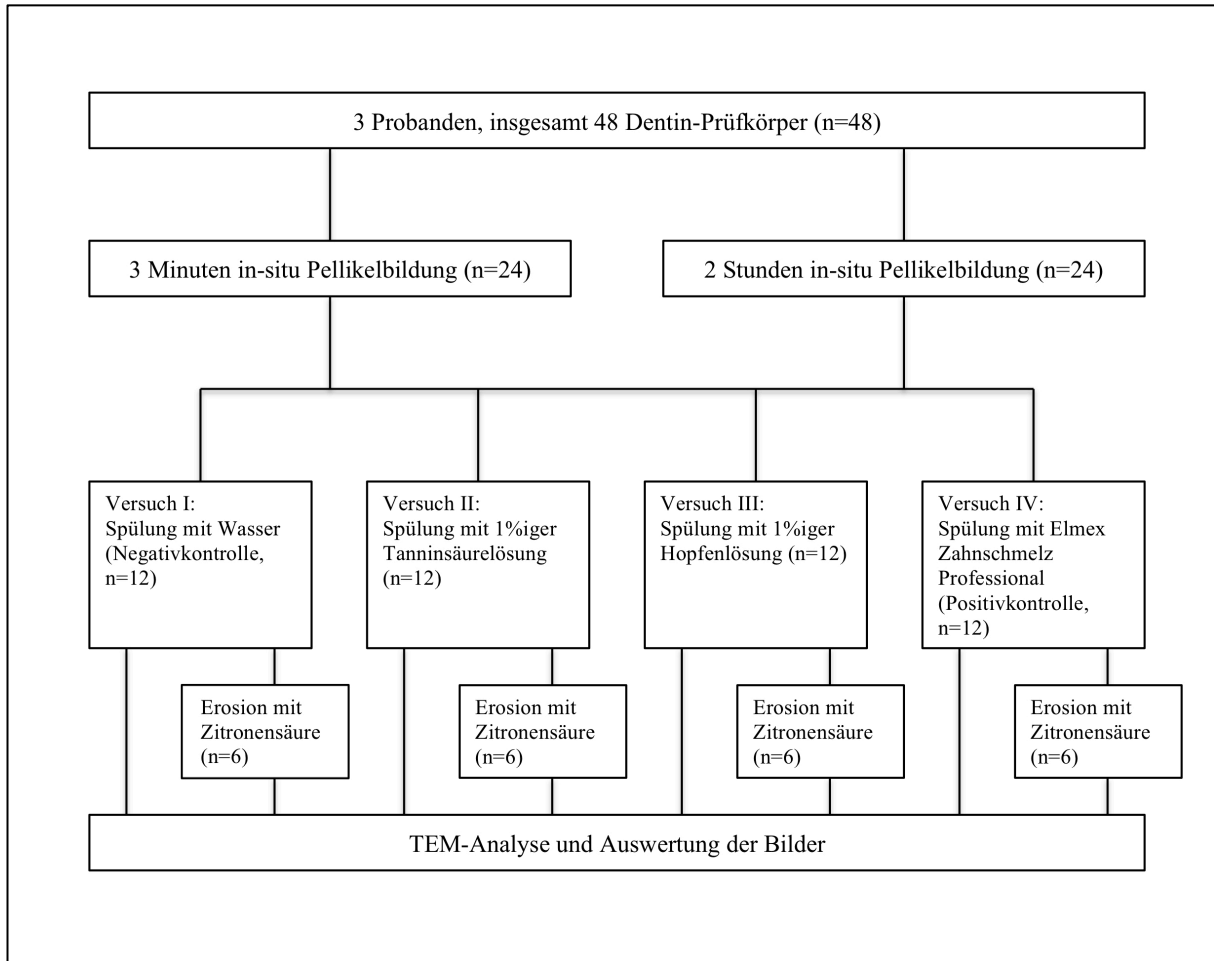


Abb. 3: Flussdiagramm zum Versuchsablauf

3.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

3.5.1 Fixierung und Osmierung der Prüfkörper

Nach Versuchsdurchführung wurden die pellicelbedeckten Dentinproben fixiert, indem sie bis zu ihrer Weiterverarbeitung in einem 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit 1 ml TEM-Fixierlösung, bestehend aus 1% Glutaraldehyd, 1% Paraformaldehyd und 0,1 M Cacodylatpuffer, bei 4 °C gelagert wurden. Im ersten

Schritt der Weiterverarbeitung wurden die PK für 24 h in 0,1 M Cacodylatpuffer gelegt. Anschließend wurden die pellikelbedeckten PK mit Osmiumtetroxid nachfixiert.

3.5.2 Entwässerung und Einbettung der Prüfkörper

Die Einbettung der PK erfolgte an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Am ersten Tag wurden die PK mittels Ethanol (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) in aufsteigenden Konzentrationen von 50% bis 100% und Aceton dehydratisiert und über Nacht in einem Gemisch aus Araldit CY212 (Agar Scientific Ltd, Essex, United Kingdom), 2-Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid (DDSA) (Agar Scientific Ltd, Essex, United Kingdom), 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (SERVA Electrophoreses GmbH, Heidelberg, Deutschland) und Aceton gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die PK in ebendiesem Gemisch umgesetzt. Am dritten Tag wurden die Präparate einem acetonfreien Araldit-Gemisch zugeführt und schließlich mit Hilfe einer quaderförmigen Silikonform in Araldit eingebettet. Zur Polymerisation des Araldits wurde die Silikonform für zwei Tage bei 65 °C im Brutschrank gelagert.

3.5.3 Herstellung der Ultradünnschnitte

Die auspolymerisierten Araldit-Quader wurden an der Schleifmaschine bis zur Freilegung der zur untersuchenden Prüfkörperenebene zugetrimmt und poliert. Mithilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut Leica EM UC7, Wetzlar, Deutschland) mit Diamantmesser (Microstar 45 °, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden Ultradünnschnitte mit einer Dicke von ca. 65 nm erstellt und auf ein mit einem Pioloform-Film überzogenes Kupfer-Netzchen (Grid) mit den Maßen 1 x 2 mm (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) übertragen. Im Anschluss fand eine Kontrastierung der Ultradünnschnitte mit UranylLess (Delta Microscopies, Mauressac, Frankreich) und Bleicitrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) statt.

3.5.4 Transmissionselektronenmikroskopie, Bildaufnahme und -analyse

Die Proben wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop (Tecnai 12, FEI, Eindhoven, Niederlande) unter Vergrößerungen zwischen 1000- und 98000-fach untersucht. Dazu diente das Bildanalyseprogramm iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions, Olympus, Tokio, Japan). Von charakteristischen Ausschnitten wurden Bildschirmfotos erstellt und Längenmessungen von der Pellikeldicke und Demineralisationszone durchgeführt. Weiterhin wurde die Pellikel

hinsichtlich ihrer Struktur, Kontinuität, adhärenter Bakterien und weiterer Besonderheiten, wie z.B. das Vorhandensein von Epithelzellen, bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Versuch I

4.1.1 Spülung mit sterilem Wasser ohne *in-vitro* Säureangriff

Versuch I wurde mit sterilem Wasser als Spüllösung durchgeführt und diente als Negativkontrolle. Insgesamt stellte sich nach einer Pellikelbildungszeit von 3 min eine bakterienfreie, diskontinuierlich verlaufende Pellikel mit Stärken von bis zu 340 nm dar (Abb. 4 und Abb. 5). Es konnten sowohl granulär als auch globulär strukturierte Proteinagglomerate nachgewiesen werden. Die Wände der Dentintubuli waren stellenweise ebenfalls mit Proteinagglomeraten behaftet (Abb. 6).

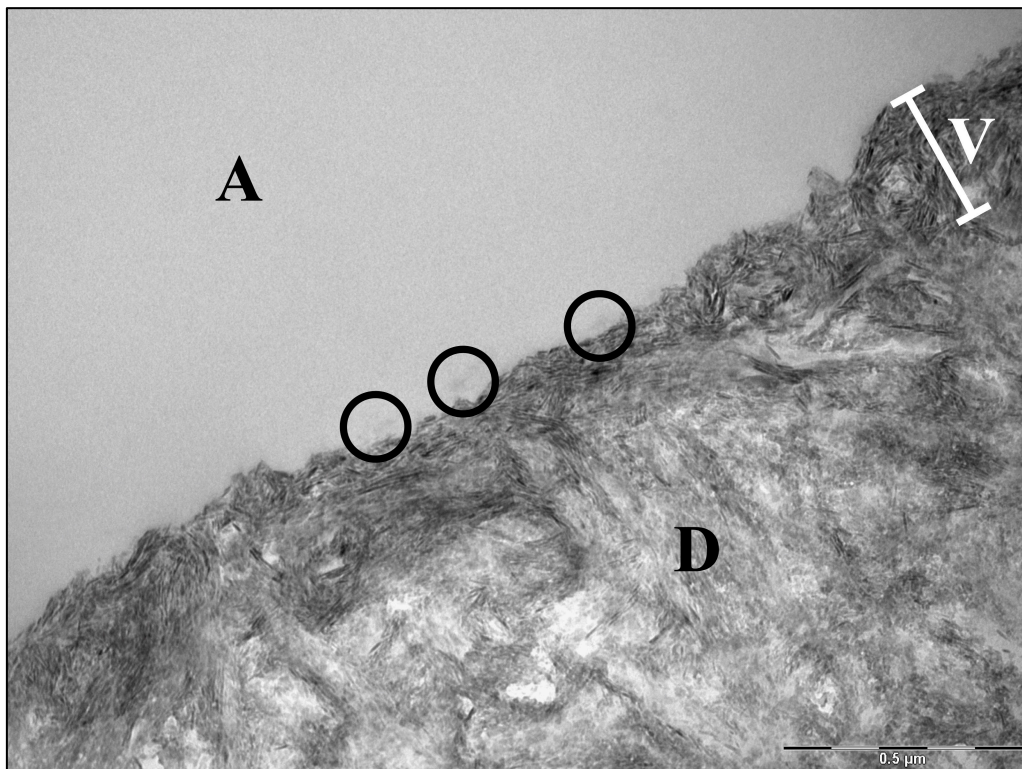


Abb. 4: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit Wasser. Einzelne Proteinagglomerate (Kreis) sind an der Dentinoberfläche zu erkennen. Darunter stellt sich eine verdichtete Dentinzone (V) dar. A = Araldit; D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 49.000-fach; Längensbalken = 500 nm

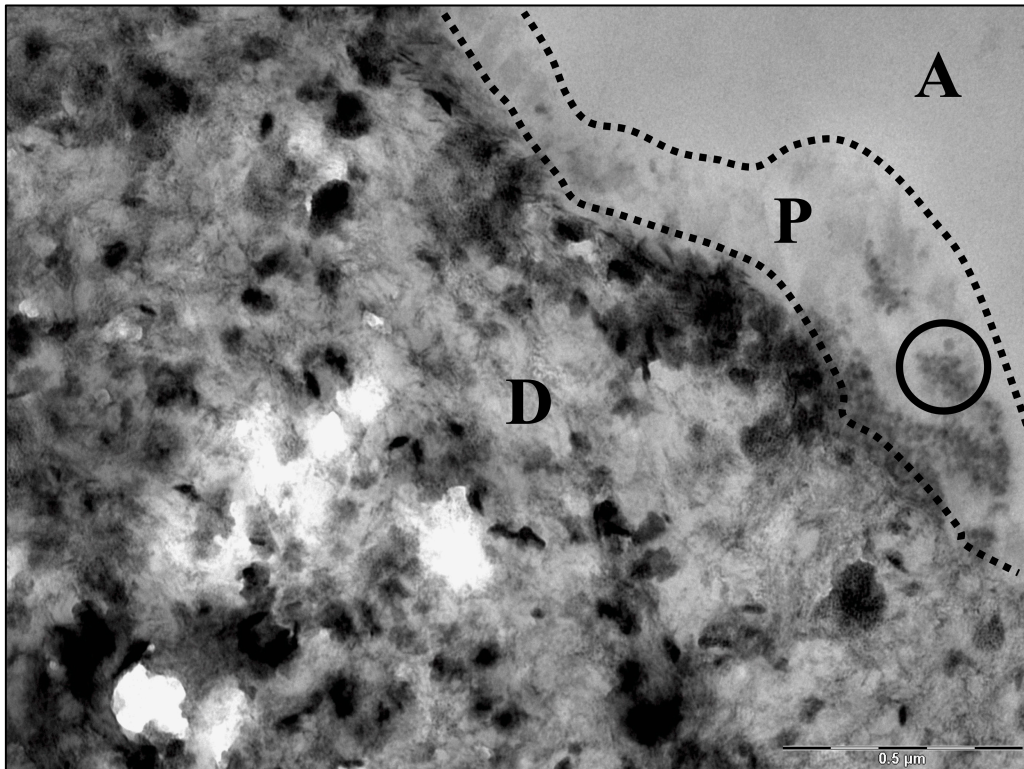


Abb. 5: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit Wasser. Einzelne elektronendichte Proteinagglomerate (Kreis) sind innerhalb der Dentinpellikel (P) zu erkennen. A = Araldit; D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 49.000-fach; Längsbalken = 500 nm

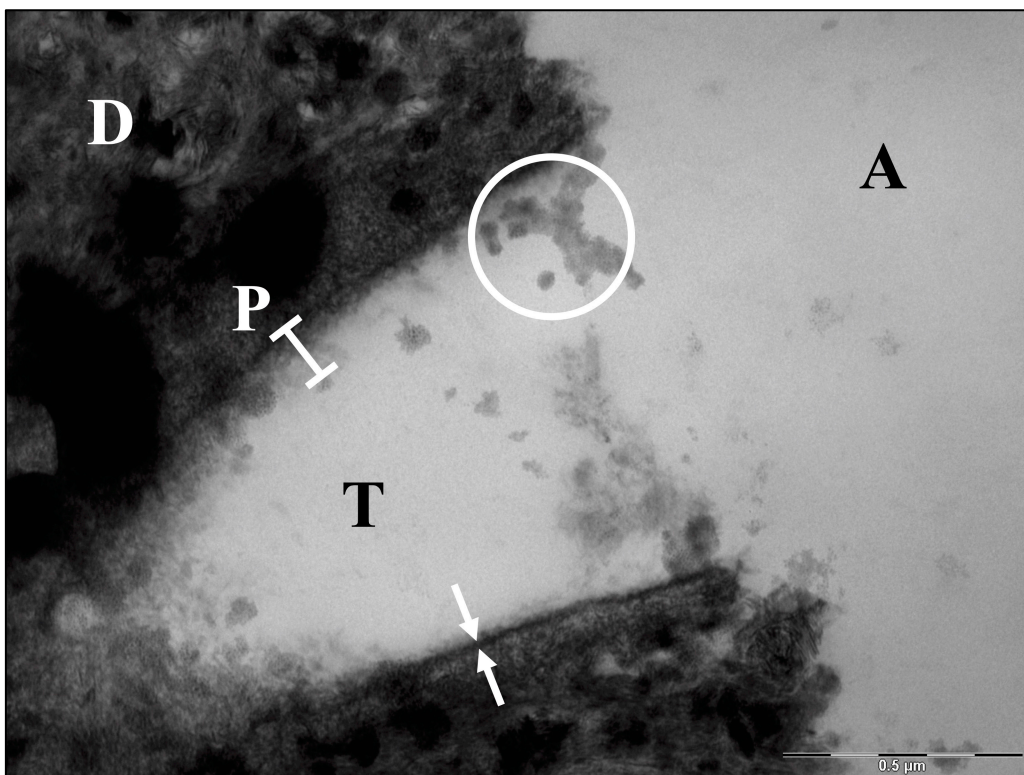


Abb. 6: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit Wasser. Einzelne Proteinagglomerate (Kreis) sind innerhalb der Dentinpellikel (P) zu erkennen. Eine dünne, elektronendichte Schicht aus peritubulärem Dentin (Pfeile) kleidet die Tubuluswand aus. A = Araldit; D = intaktes Dentin; T = Dentintubulus; Vergrößerung: 49.000-fach; Längsbalken = 500 nm

Die zwei Stunden alte Pellikel stellte sich homogener dar und war kontinuierlich auf der gesamten untersuchten Dentinoberfläche, den Tubulus-Wänden und Tubulus-Öffnungen sichtbar (Abb. 7 und Abb. 8). Die Pellikeldicke schwankte zwischen 160 nm und 2500 nm, und betrug durchschnittlich ca. 500 nm. Die 2h-Pellikel der drei Probanden setzte sich meist aus zwei Schichten zusammen. Basal war eine dünne, elektronendichte Schicht sichtbar (Abb. 7 und Abb. 9). Darauf platzierte sich eine lose strukturierte Schicht mit granulären und globulären Proteinagglomeraten (Abb. 10). Bakterien waren vereinzelt vorhanden und wurden ebenfalls in Dentintubuli nachgewiesen (Abb. 9 und Abb. 11).

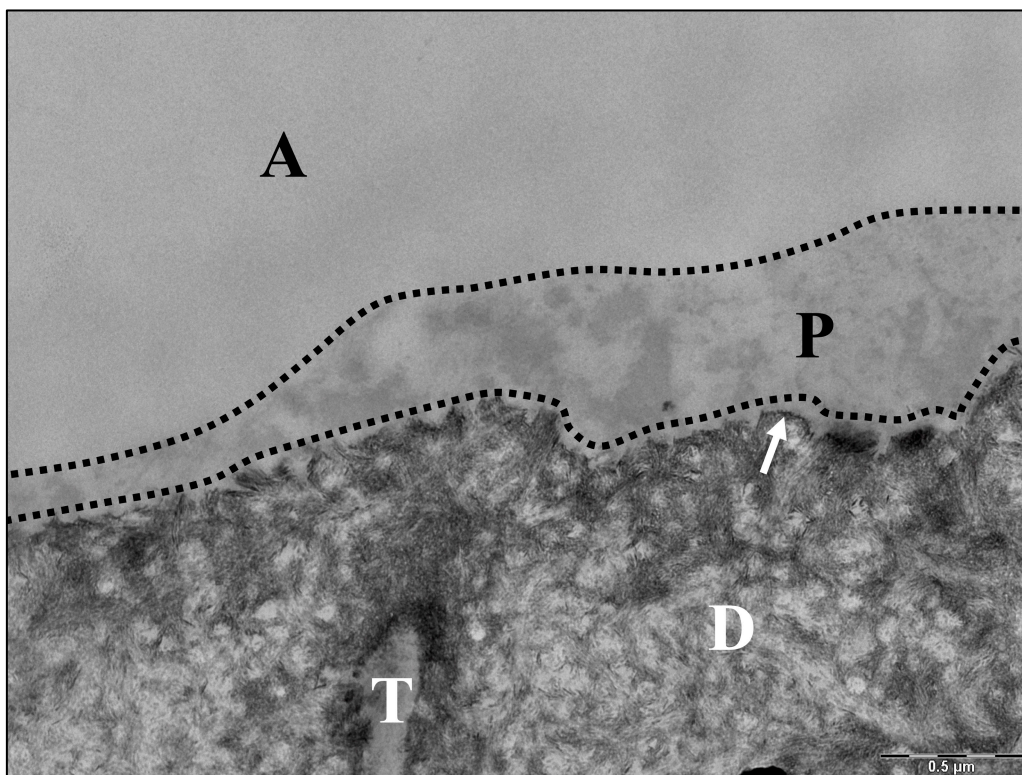


Abb. 7: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit Wasser. Eine Pellikel (P) mit globulär-granulärer Morphologie und elektronendichter Basisschicht (Pfeil) ist an der Dentinoberfläche zu erkennen. A = Araldit; D = intaktes Dentin; T = Dentintubulus; Vergrößerung: 30.000-fach; Längsbalken = 500 nm

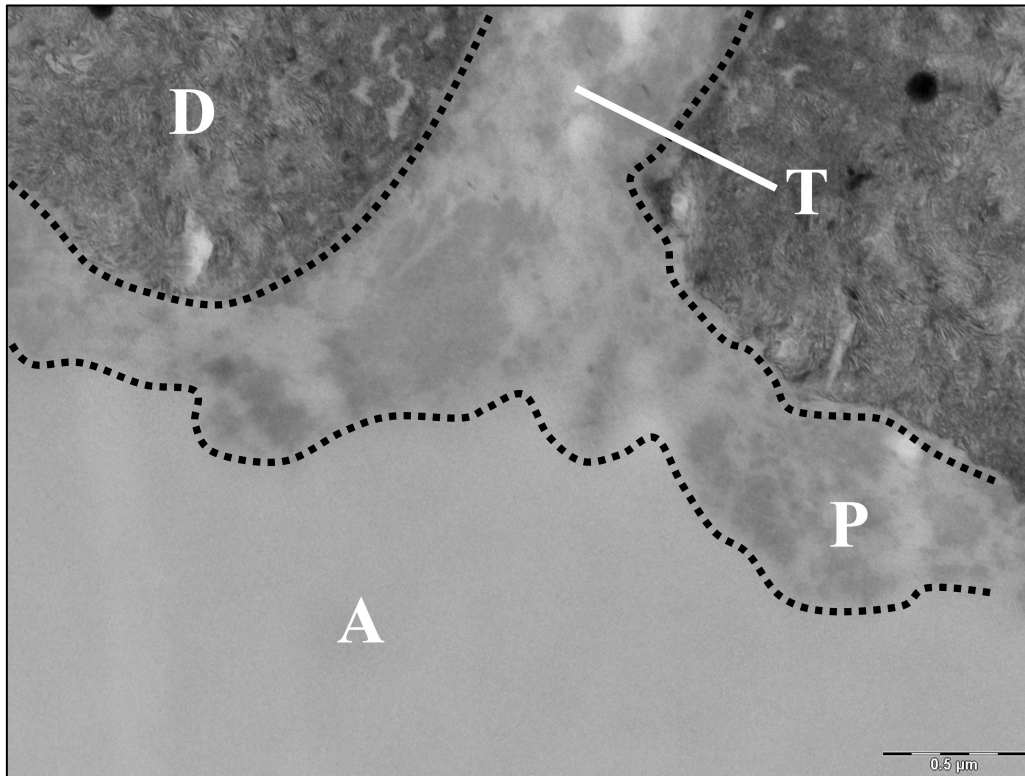


Abb. 8: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit Wasser. Eine Pellikel (P) mit globulär-granulärer Morphologie ist am Tubuluseingang (T) und an der Dentinoberfläche zu erkennen. A = Araldit; D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 30.000-fach; Längsbalken = 500 nm

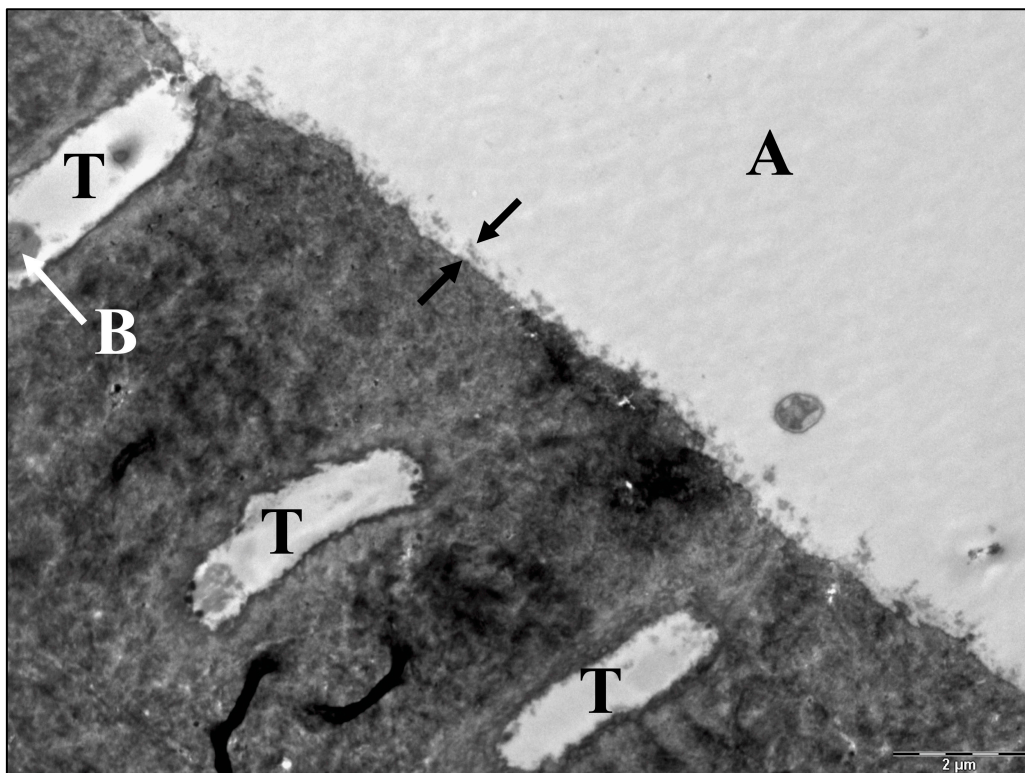


Abb. 9: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit Wasser. Eine Pellikel mit elektronendichter Basisschicht (Pfeile) ist an der Dentinoberfläche zu erkennen. Ein Bakterium (B) ist in den oberen Tubulus (T) penetriert. A = Araldit; Vergrößerung: 6.800-fach; Längsbalken = 2000 nm

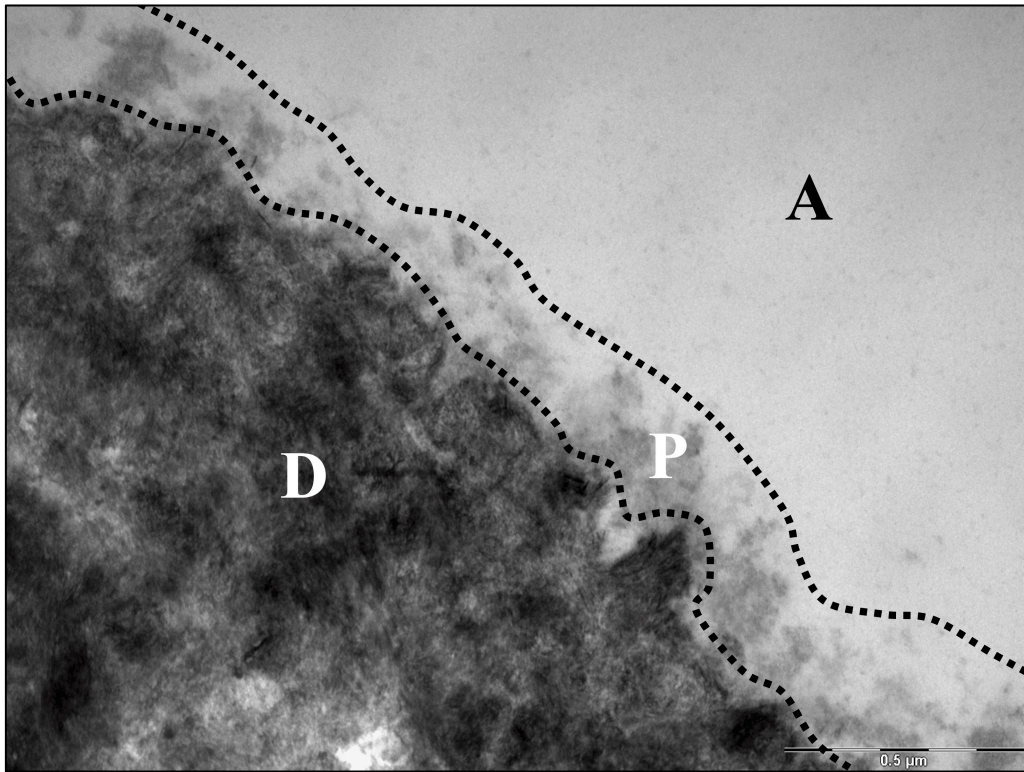


Abb. 10: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit Wasser. Eine Pellikel (P) mit globulär-granulärer Morphologie ist an der Dentinoberfläche zu erkennen. A = Araldit; D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 49.000-fach; Längsbalken = 500 nm

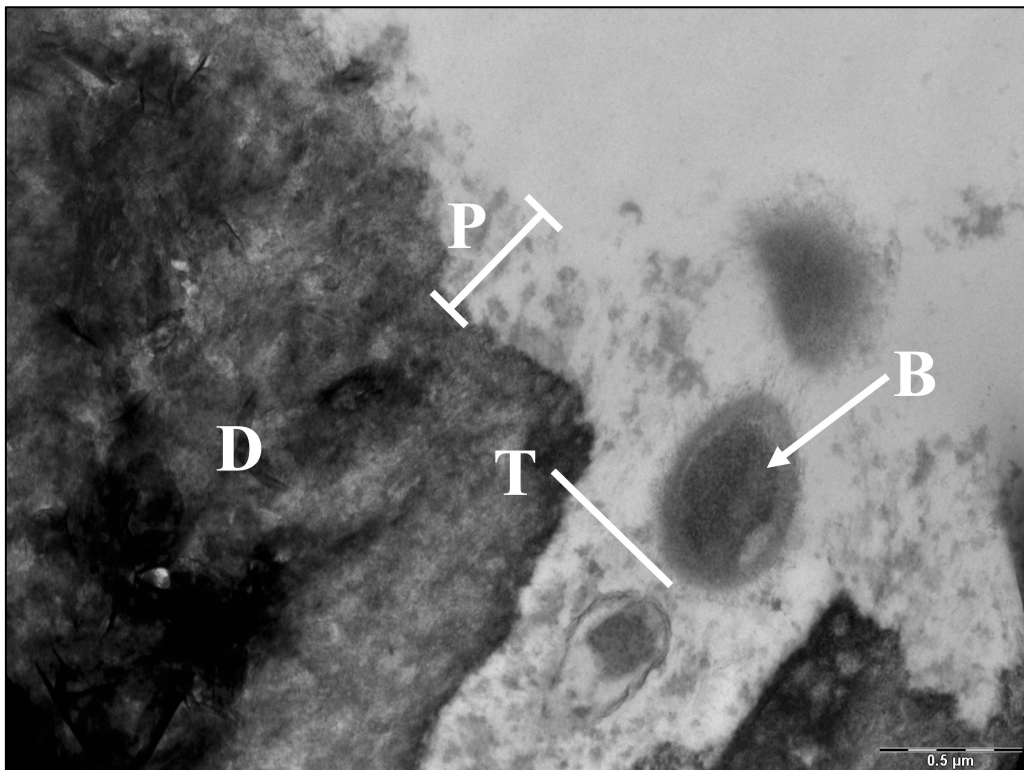


Abb. 11: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit Wasser. Eine Pellikel (P) ist an der Dentinoberfläche und am Tubuluseingang erkennbar. Bakterien (B) penetrieren den Tubuluseingang (T). D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 30.000-fach; Längsbalken = 500 nm

4.1.2 Spülung mit sterilem Wasser und *in-vitro* Säureangriff

Der Säureangriff mit 1%iger Zitronensäure hinterließ auf jedem untersuchten PK der Kontrollgruppe eine Demineralisationszone. Die 3min-Pellikel aller Probanden war stellenweise dissoziiert und heterogen mit Schichtstärken zwischen 0 nm und 300 nm verlaufend (Abb. 12 bis Abb. 14). Es konnten Erosionstiefen bis zu 1400 nm nachgewiesen werden, durchschnittlich war die Demineralisationszone jedoch ca. 400 nm breit (Abb. 12 bis Abb. 14).

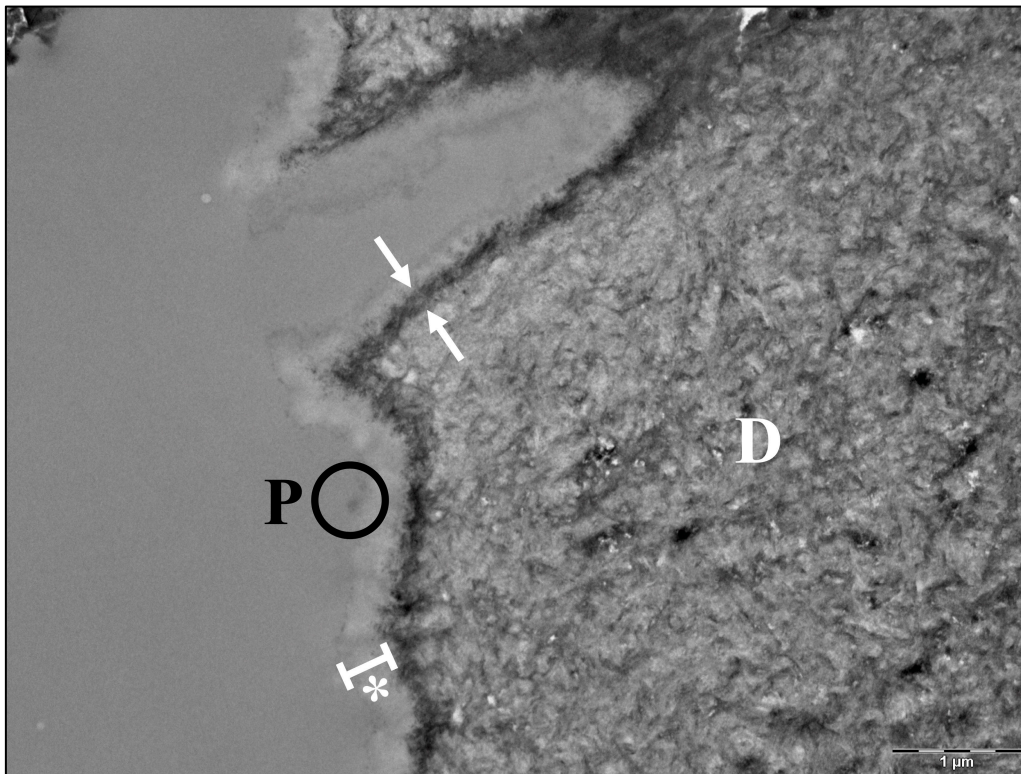


Abb. 12: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit Wasser und *in-vitro* Säureangriff. Einzelne Proteinagglomerate (P) sind an der Dentinoberfläche zu erkennen. Die Dentinoberfläche setzt sich aus einer äußeren Demineralisationszone (*) und einer darunterliegenden verdichteten Zone (Pfeile) zusammen. D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 13.000-fach; Längensbalken = 1000 nm

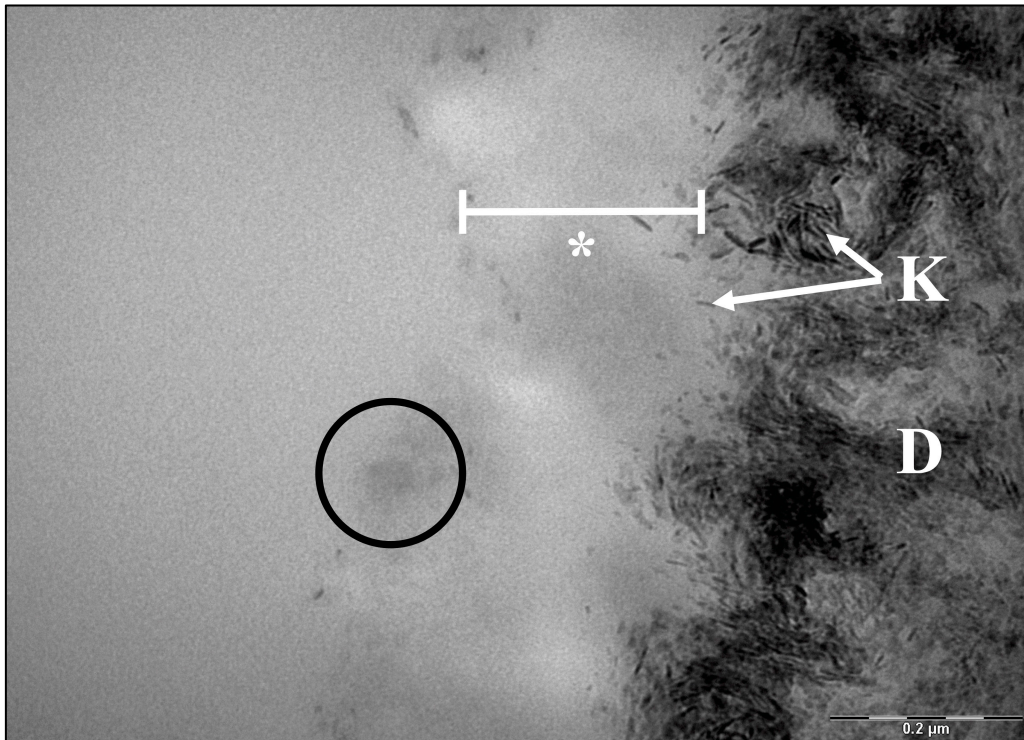


Abb. 13: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit Wasser und *in-vitro* Säureangriff. Der Säureangriff hinterlässt eine ausgeprägte Demineralisationszone (*) an der Dentinoberfläche. Einzelne Proteinagglomerate (Kreis) sind auf der demineralisierten Dentinoberfläche zu erkennen. Hydroxylapatit-Kristallite (K) präzipitieren am Übergang zwischen intaktem Dentin (D) und demineralisiertem Dentin (*). Vergrößerung: 98.000-fach; Längsbalken = 200 nm

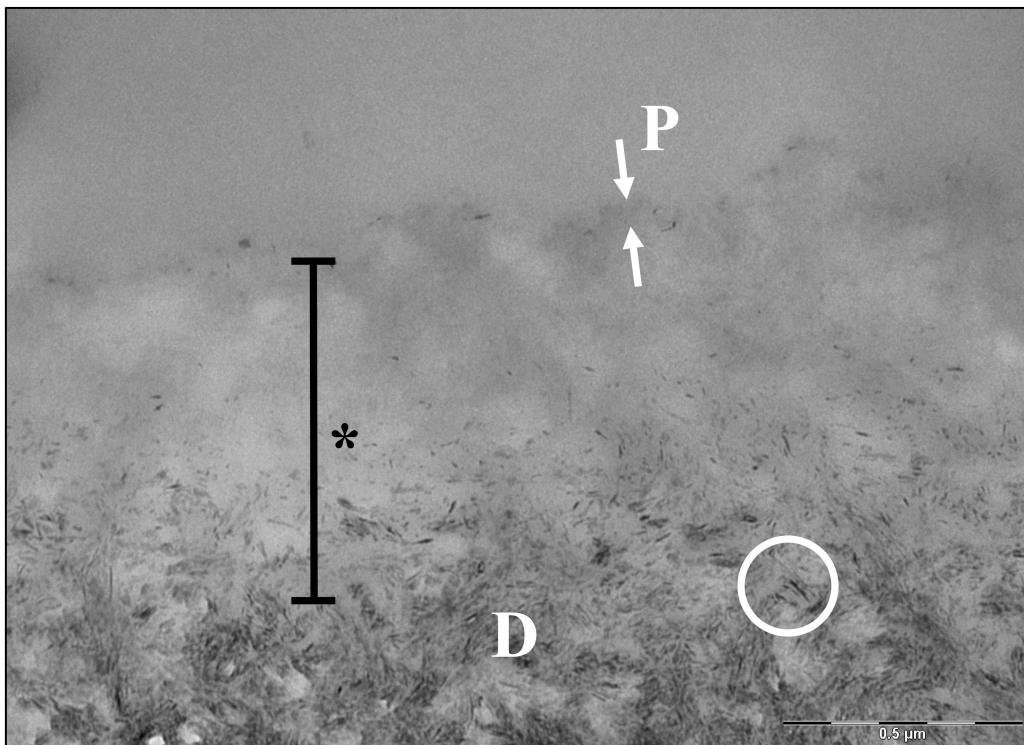


Abb. 14: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit Wasser und *in-vitro* Säureangriff. Innerhalb der breiten Demineralisationszone (*) sind die Hydroxylapatit-Kristallite (Kreis) insbesondere im basalen Anteil erkennbar. Eine schwach sichtbare Pellicel (P) grenzt an die Demineralisationszone (*). D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 49.000-fach; Längsbalken = 500 nm

Die durchschnittliche Dicke der 2h-Pellikel nach Säureangriff war mit ca. 300 nm etwas geringer im Vergleich zur 2h-Pellikel ohne Säureangriff. Die Pellikel war bei allen Probanden kontinuierlich verlaufend und stets granulär-globulär strukturiert (Abb. 15 bis Abb. 17). Die durchschnittliche Stärke der Demineralisationszone betrug ca. 300 nm. Einzelne Bakterien konnten in der 2h-Pellikel nachgewiesen werden (Abb. 17).

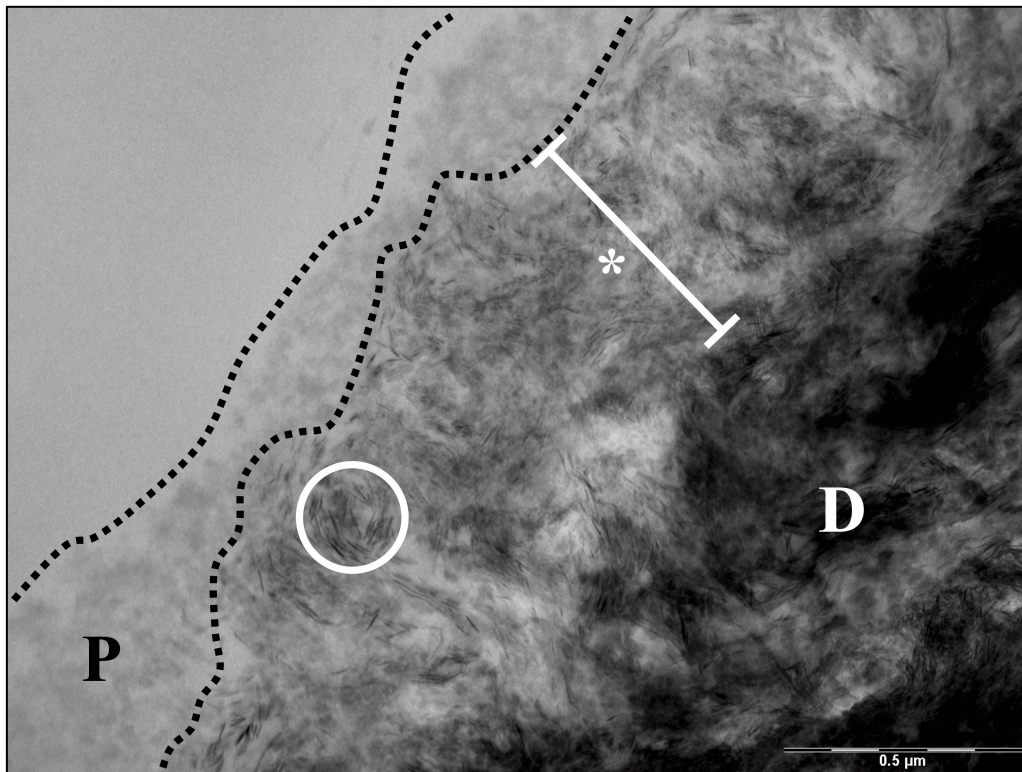


Abb. 15: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit Wasser und *in-vitro* Säureangriff. Es ist eine Pellikel (P) mit globulär-granulärer Morphologie an der Dentinoberfläche erkennbar. Innerhalb der Demineralisationszone (*) kommen nadelförmige Hydroxylapatit-Kristallite (Kreis) mit einer Länge von ca. 60 nm vor. Die Verteilung dieser Kristallite ist randomisiert. D = intaktes Dentin
Vergrößerung: 49.000-fach; Längensbalken = 500 nm

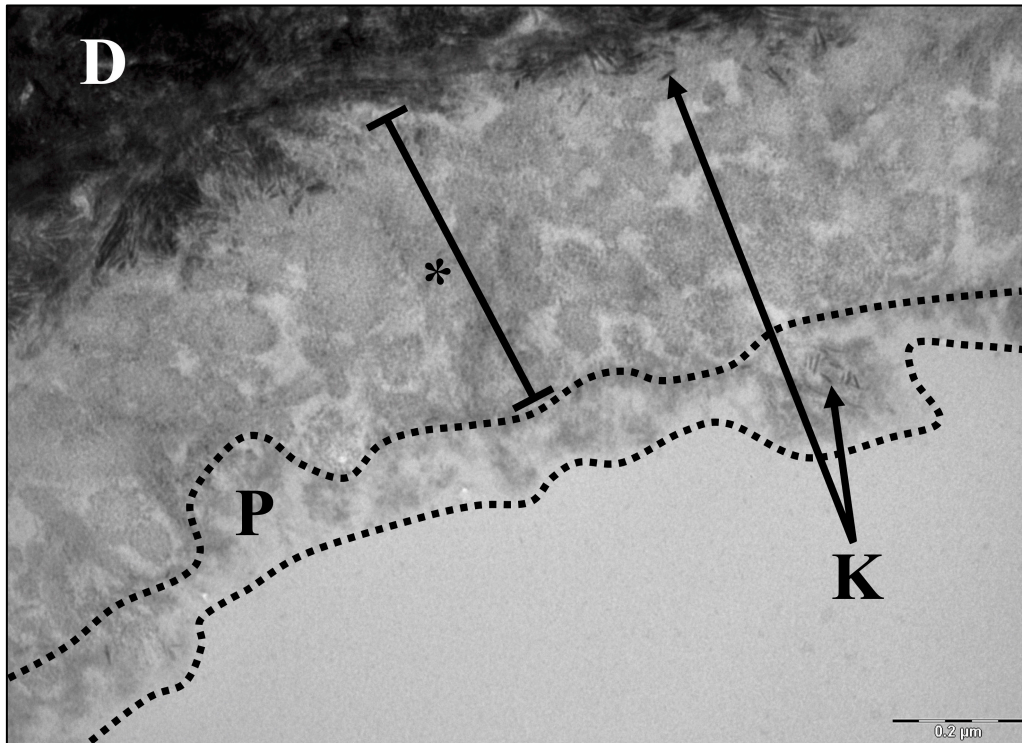


Abb. 16: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit Wasser und *in-vitro* Säureangriff. Es ist eine Pellicel (P) mit globulär-granulärer Morphologie an der Dentin Oberfläche zu erkennen. Die wolkenartig strukturierte Demineralisationszone (*) besteht aus einem Kollagenfibrillen-Netzwerk. Hydroxylapatit-Kristallite (K) sind innerhalb der Pellicel und im Grenzbereich zwischen intaktem Dentin (D) und demineralisiertem Dentin (*) ersichtlic. Vergrößerung: 68.000-fach; Längenbalken = 200 nm

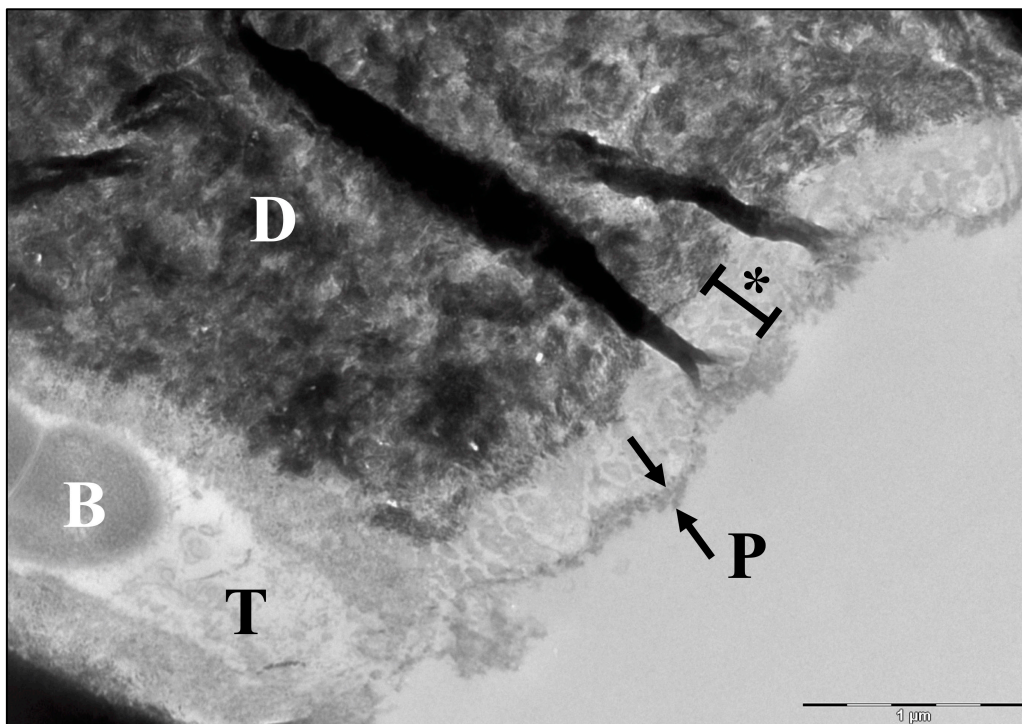


Abb. 17: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit Wasser und *in-vitro* Säureangriff. Es ist eine Pellicel (P) mit granulärer Morphologie auf Dentin (D) erkennbar. Die wolkenartig strukturierte Demineralisationszone (*) besteht aus einem Kollagenfibrillen-Netzwerk. Ein Bakterium (B) ist in den Dentintubulus (T) penetriert. Vergrößerung: 23.000-fach; Längenbalken = 1000 nm

4.2 Versuch II

4.2.1 Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung ohne *in-vitro* Säureangriff

Versuch II wurde mit 1%iger Tanninsäurelösung als Spüllösung durchgeführt. Die untersuchten Präparate mit einer 3min-Pellikel wiesen Pellikelstärken von 50 nm bis 400 nm auf (Abb. 18 bis Abb. 20). Die Pellikel verlief diskontinuierlich und war in ihrer Struktur sehr different. Die Probanden wiesen in den meisten Fällen eine granulär-globulär strukturierte Pellikel mit Proteinagglomeraten auf (Abb. 18 bis Abb. 20). Im Vergleich zur Kontroll-Pellikel (Versuch I) wies die Pellikel nach Spülung mit Tanninsäure tendenziell eine höhere elektronendichte sowie eine höhere Dicke auf. Es konnten Demineralisationen an PK-Oberflächen aller Probanden beobachtet werden. Diese Demineralisationszonen hatten eine Tiefe von 130 nm bis 420 nm (Abb. 18 bis Abb. 20). Bakterien wurden sowohl im Dentintubulus (Abb. 21), als auch auf der Dentinoberfläche (Abb. 22) identifiziert. Die elektronendichte Basisschicht war stellenweise sehr gut erkennbar (Abb. 22).

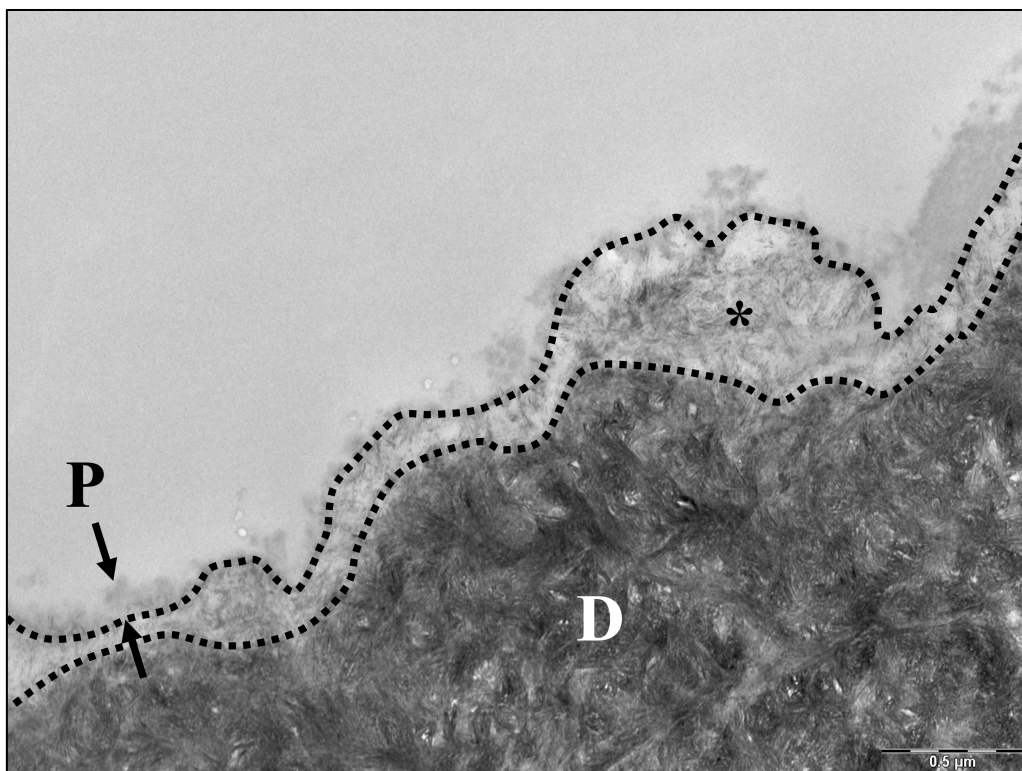


Abb. 18: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung. Es ist eine Pellikel mit Proteinagglomeraten (P) erkennbar. Die Demineralisationszone (*) hat keine konstante Erosionstiefe. D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 30.000-fach; Längensbalken = 500 nm

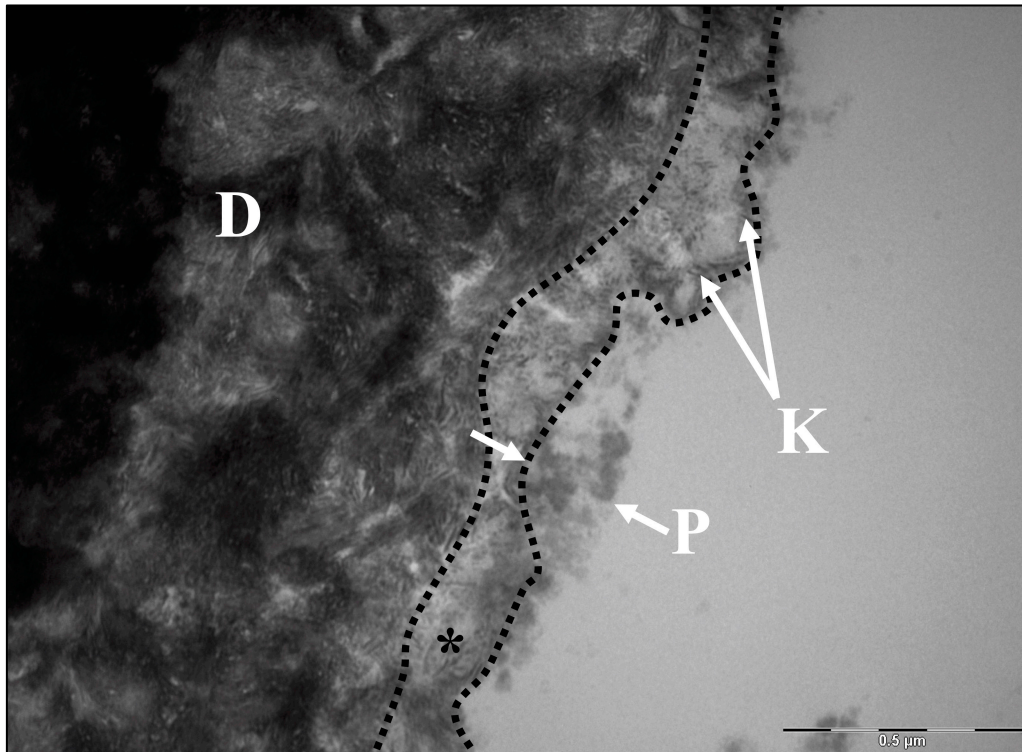


Abb. 19: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung. Es ist eine Pellikel (P) mit granulär-globulärer Morphologie erkennbar. Die Demineralisationszone (*) enthält nadelartige Hydroxylapatit-Kristallite (K). D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 49.000-fach; Längsbalken = 500 nm

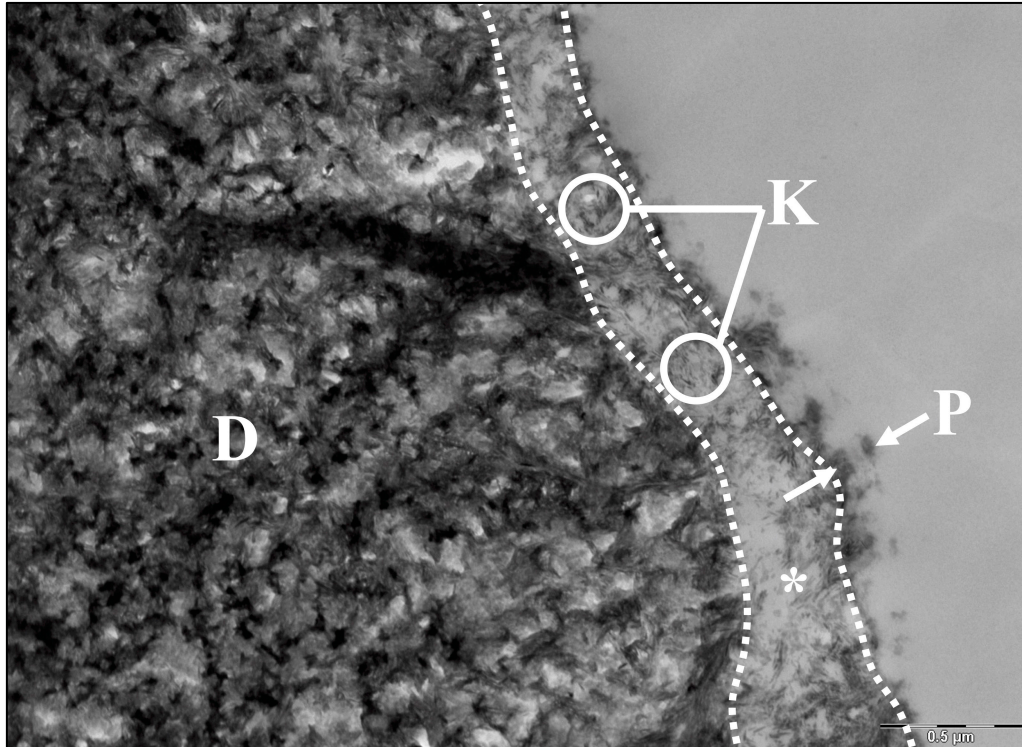


Abb. 20: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung. Es ist eine Pellikel (P) mit granulär-globulär Morphologie erkennbar. Die Demineralisationszone (*) enthält nadelartige Hydroxylapatit-Kristallite (K). D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 30.000-fach; Längsbalken = 500 nm

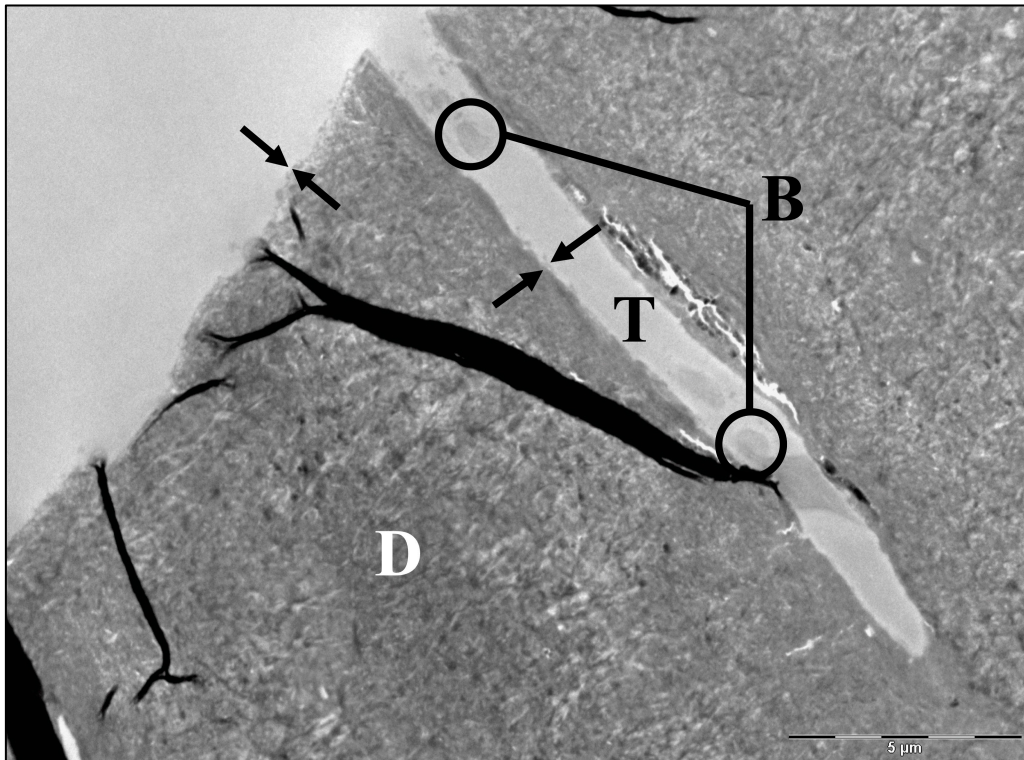


Abb. 21: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung. Es sind einzelne Proteinagglomerate (Pfeile) an der Dentinoberfläche und der Tubuluswand erkennbar. Bakterien (B) haben den Dentintubulus (T) penetriert. D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 4.800-fach; Längenbalken = 5000 nm

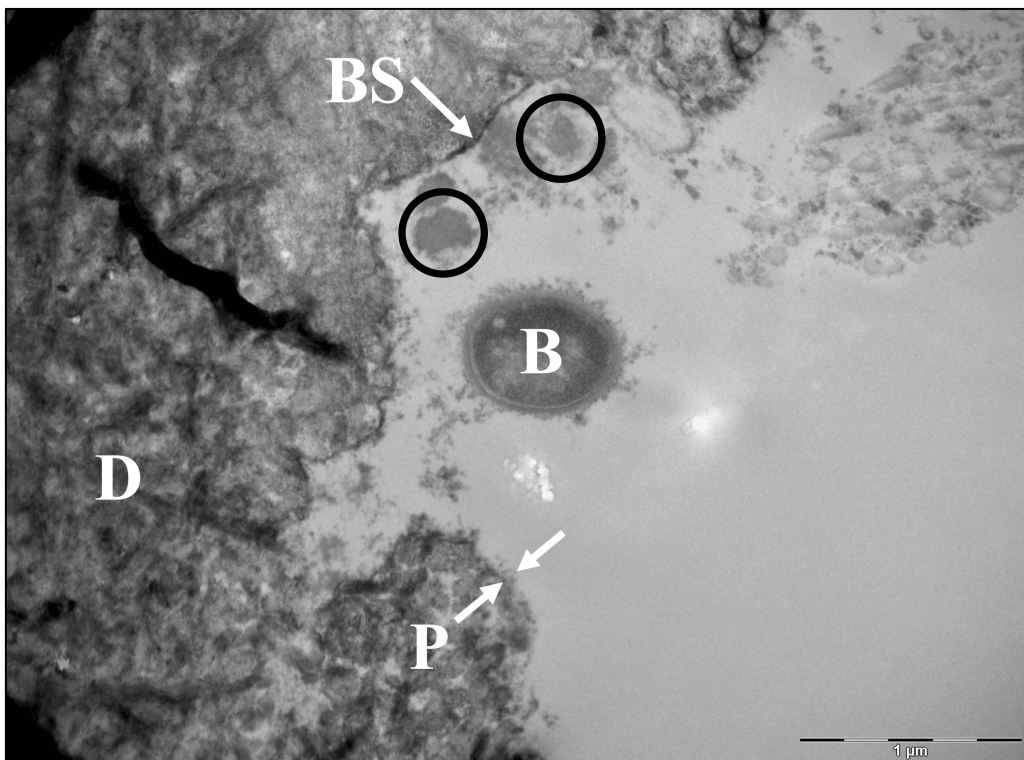


Abb. 22: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung. Es stellt sich eine Pellicel (P) mit deutlich sichtbarer elektronendichter Basisschicht (BS) und vereinzelt Proteinagglomeraten (Kreis) dar. In der Mitte der Abbildung ist ein adhärenes Bakterium (B) erkennbar. Vergrößerung: 23.000-fach; Längenbalken = 1000 nm

Die 2h-Pellikel wies eine durchschnittliche Pellikeldicke von ca. 600 nm auf. Die Pellikel stellte sich stets als kontinuierlich verlaufende Schicht mit gemischt globulären und granulären Strukturen an der Dentinoberfläche dar (Abb. 23 bis 25). Die Dentinoberfläche zweier Probanden war bis zu einer Tiefe von 620 nm demineralisiert (Abb. 23 und Abb. 25). Bakterien konnten in der 2h-Pellikel aller drei Probanden nachgewiesen werden (Abb. 25).

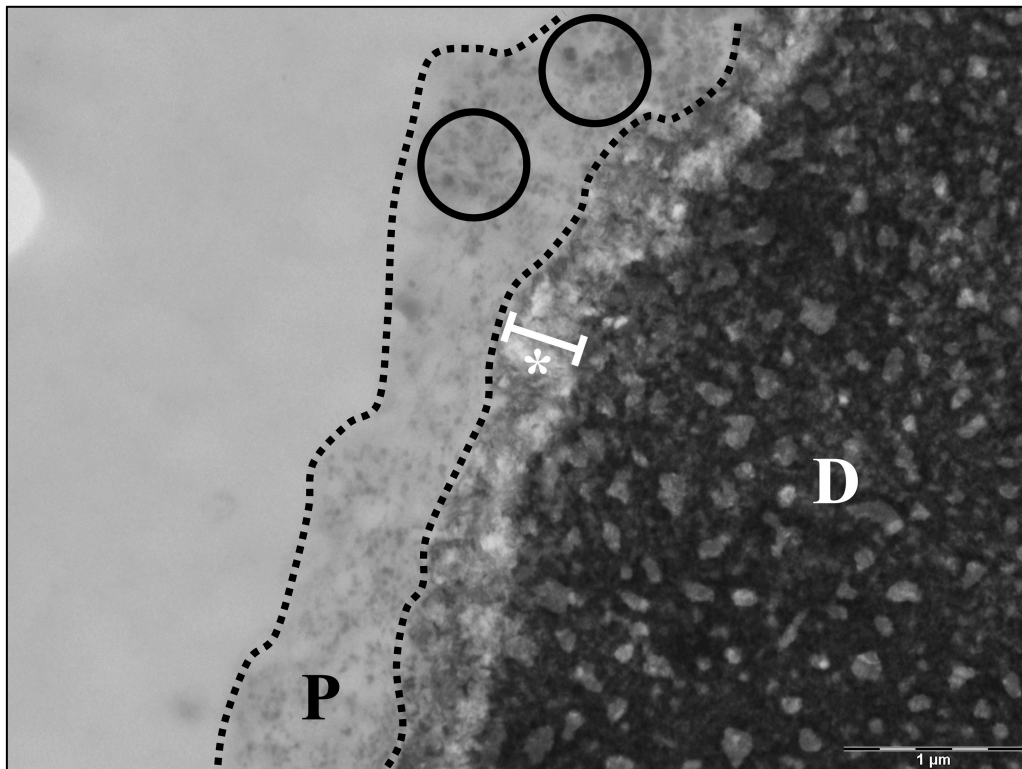


Abb. 23: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung. Es ist eine Pellikel (P) mit größtenteils granulärer Morphologie (Kreis) an der Dentinoberfläche erkennbar. Die Dentinoberfläche ist demineralisiert (*) und gut vom elektronendichteren, intakten Dentin (D) abgegrenzt. Vergrößerung: 18.500-fach; Längensbalken = 1000 nm

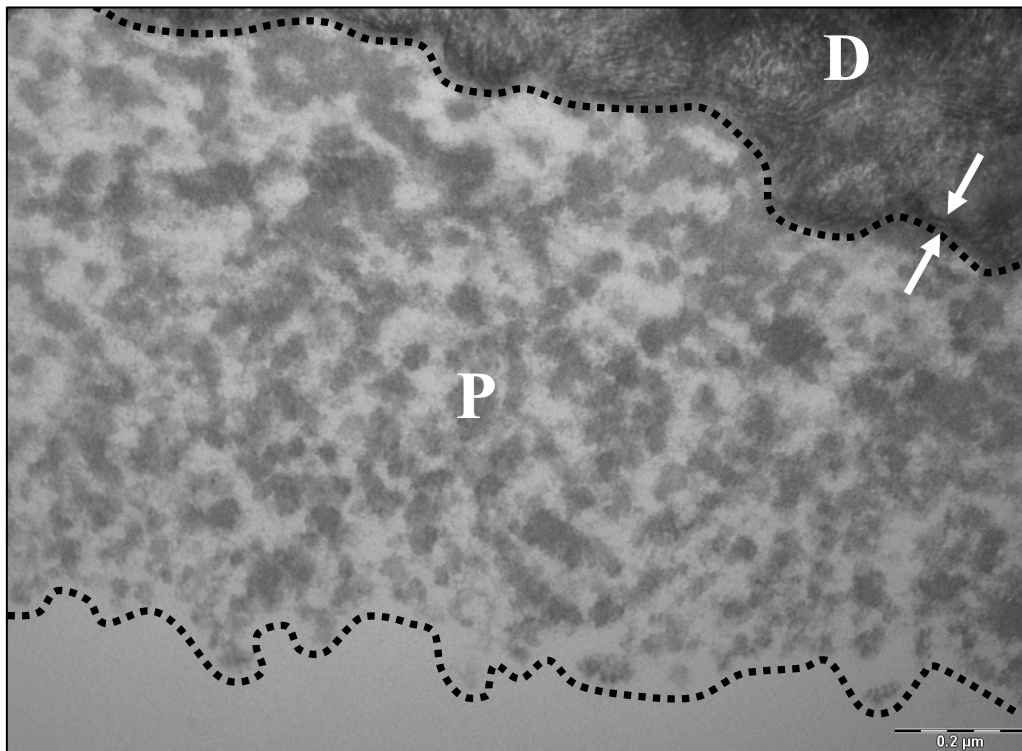


Abb. 24: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung. Die Aufnahme mit höherer Vergrößerung zeigt die aus vielen Proteinagglomeraten bestehende Pellikel (P) im Detail. Die Pfeile zeigen auf die gut erkennbare elektronendichte Basisschicht der Pellikel. D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 68.000-fach; Längsbalken = 200 nm

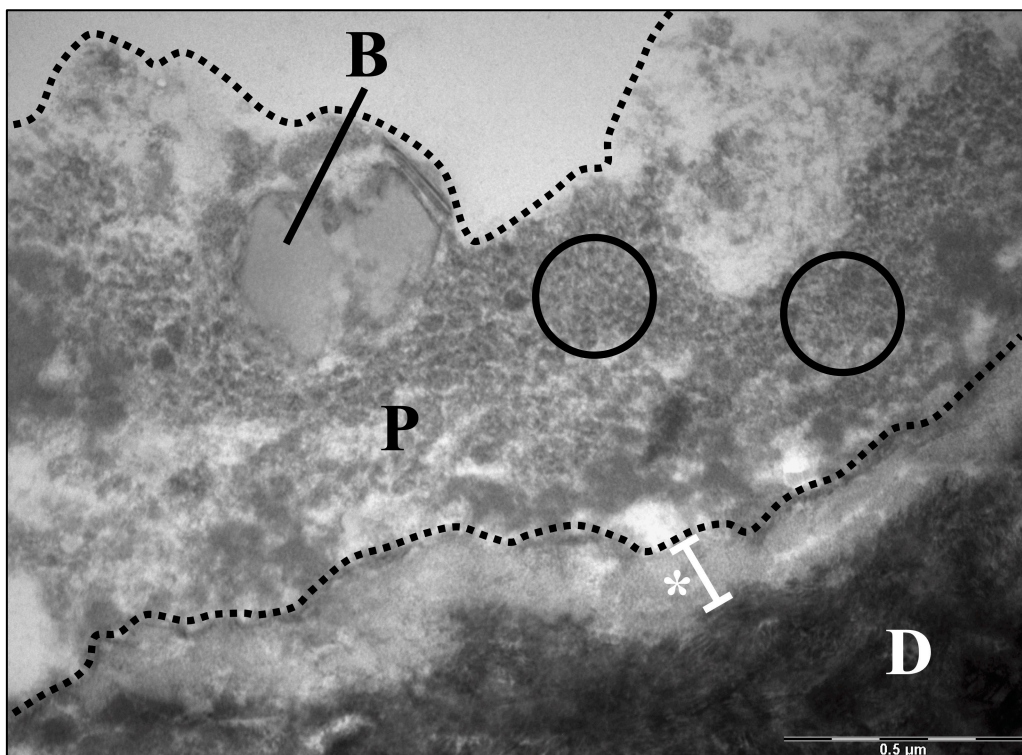


Abb. 25: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung. Es ist eine Pellikel (P) mit granulär-globulärer Morphologie und vielen Proteinagglomeraten (Kreis) erkennbar. Die Demineralisationszone (*) mit einer kontinuierlichen Erosionstiefe ist zwischen Pellikel (P) und intaktem Dentin (D) ersichtlich. Bakterienreste (B) sind im äußeren Teil der Pellikel eingebettet. Vergrößerung: 49.000-fach; Längsbalken = 500 nm

4.2.2 Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung und *in-vitro* Säureangriff

Nach Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung und anschließendem Säureangriff mit 1%iger Zitronensäure war an sämtlichen 3min- und 2h-PK eine Demineralisationszone sichtbar. Diese war bei den Präparaten mit einer 3min-Pellikel 120 nm bis 880 nm breit (Abb. 26 bis Abb. 28). Präparate mit einer 2h-Pellikel hingegen wiesen niedrigere Erosionstiefen von 100 nm bis 400 nm auf (Abb. 29 bis Abb. 31). Bei hohen Vergrößerungen waren elektronendichte, nadel-förmige Hydroxylapatit-Kristalle im Bereich der Demineralisationszone zu erkennen (Abb. 27 und Abb. 30). Die Pellikeldicken waren bei den 2h-Präparaten stets höher als bei den 3min-Präparaten (Abb. 26 bis Abb. 31). Der Pellikelverlauf war nach einer 2-stündigen Pellikelbildungszeit kontinuierlich (Abb. 29 bis Abb. 31), im Gegensatz zu der diskontinuierlich verlaufenden 3min-Pellikel (Abb. 26 bis Abb. 28). Sowohl die 3min-PK als auch die 2h-PK hatten eine Pellikel mit granulär-globulären Proteinagglomeraten, ausgenommen der 3min-Pellikel eines Probanden. Diese bestand ausschließlich aus granulär strukturierten Pellikelkomponenten (Abb. 27). Bakterien konnten in den 2h-Pellikeln der Probanden nachgewiesen werden (Abb. 31).

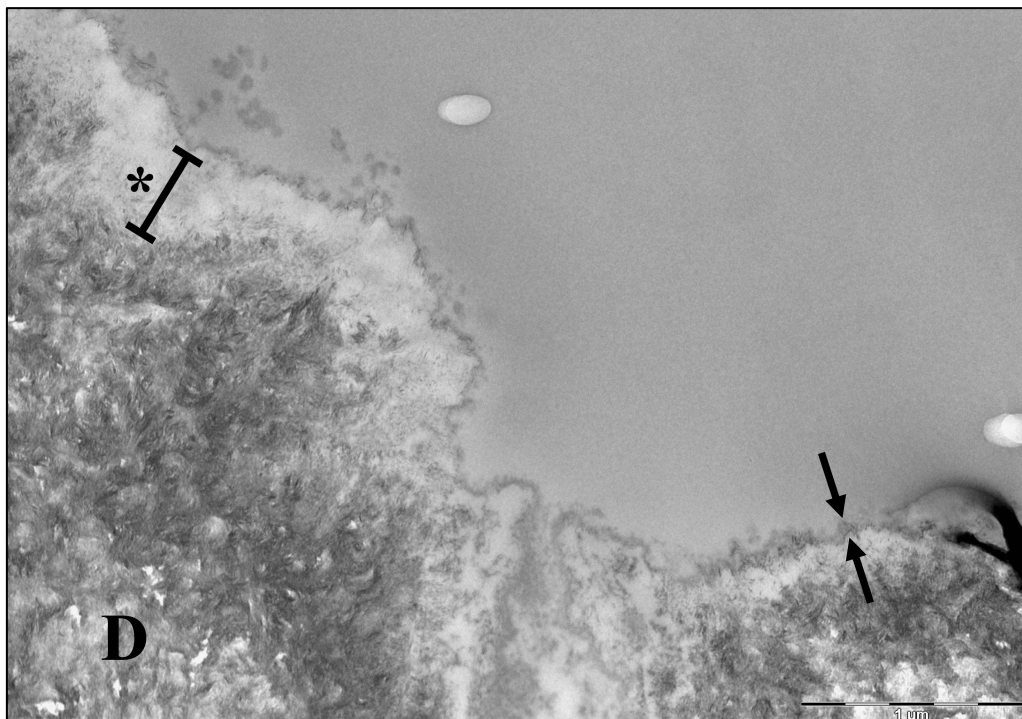


Abb. 26: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung und *in-vitro* Säureangriff. Eine Pellikel (Pfeile) mit elektronendichter Basisschicht ist erkennbar. Die Erosionstiefen der Demineralisationszone (*) sind nicht einheitlich. Im linken Teil der Abbildung konnten Erosionstiefen bis zu 400 nm, im rechten Teil der Abbildung bis zu 200 nm gemessen werden. D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 23.000-fach; Längsbalken = 1000 nm

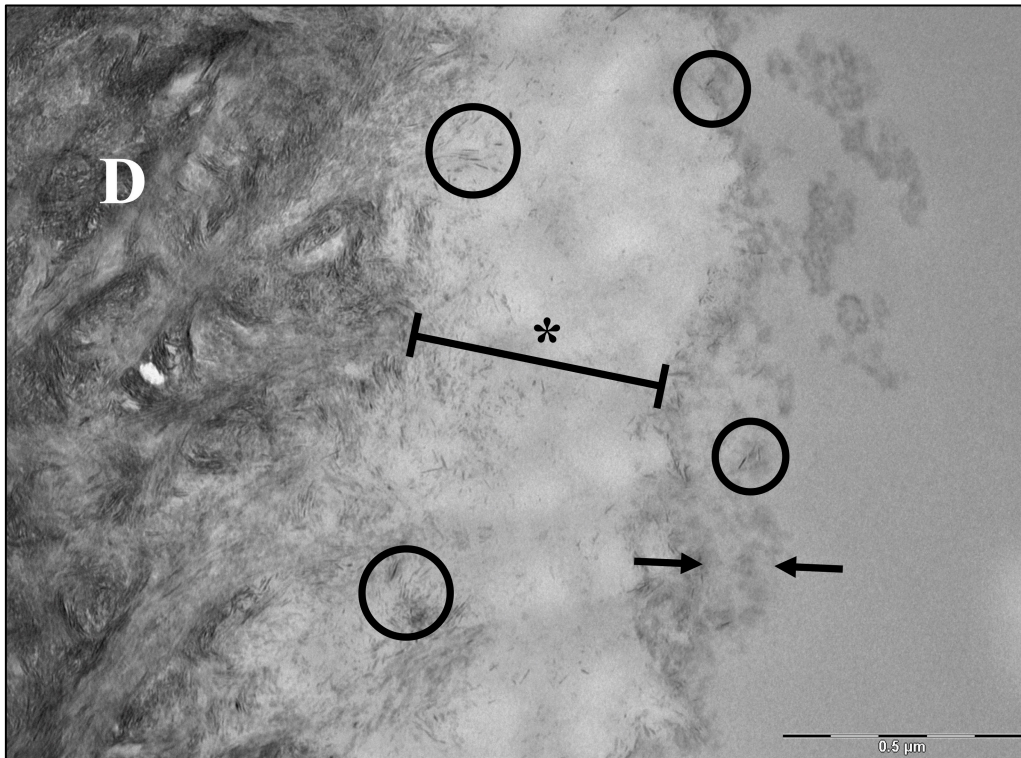


Abb. 27: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung und *in-vitro* Säureangriff. Hydroxylapatit-Kristallite (Kreis) sind sowohl in der Demineralisationszone (*) als auch in der Pellikel (Pfeile) nachweisbar. Sie haben eine nadelförmige Morphologie. D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 49.000-fach; Längsbalken = 500 nm

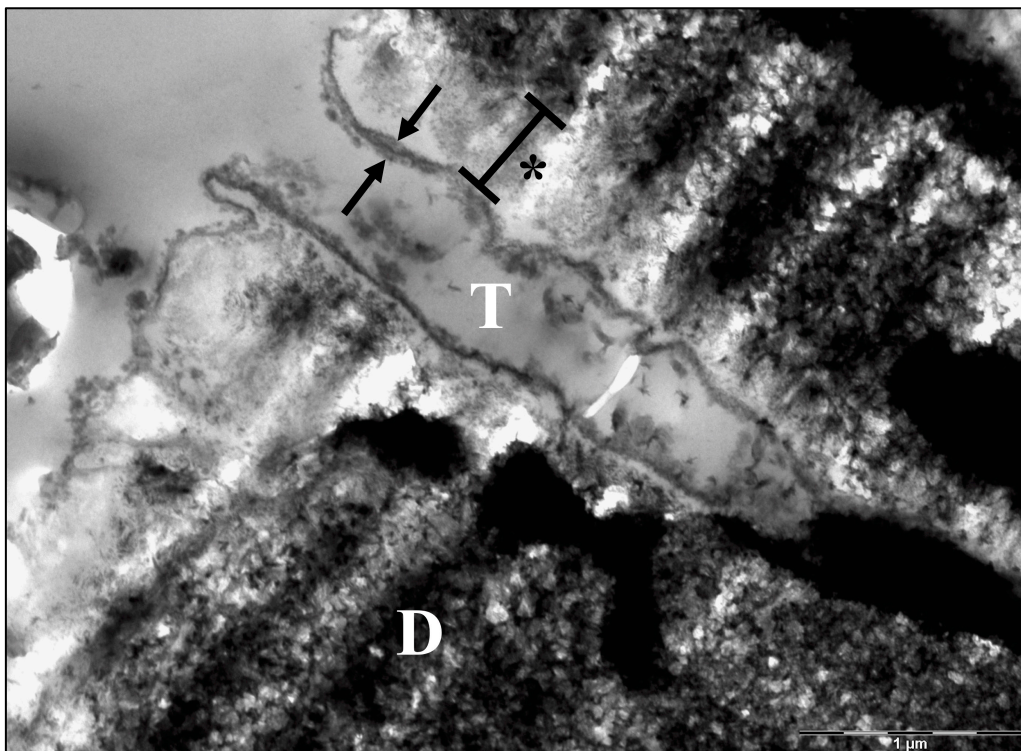


Abb. 28: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung und *in-vitro* Säureangriff. Die Aufnahme zeigt einen Dentintubulus (T) mit einer Pellikel (Pfeile). Neben der Dentinoberfläche ist auch die Tubuluswand demineralisiert (*). D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 23.000-fach; Längsbalken = 1000 nm

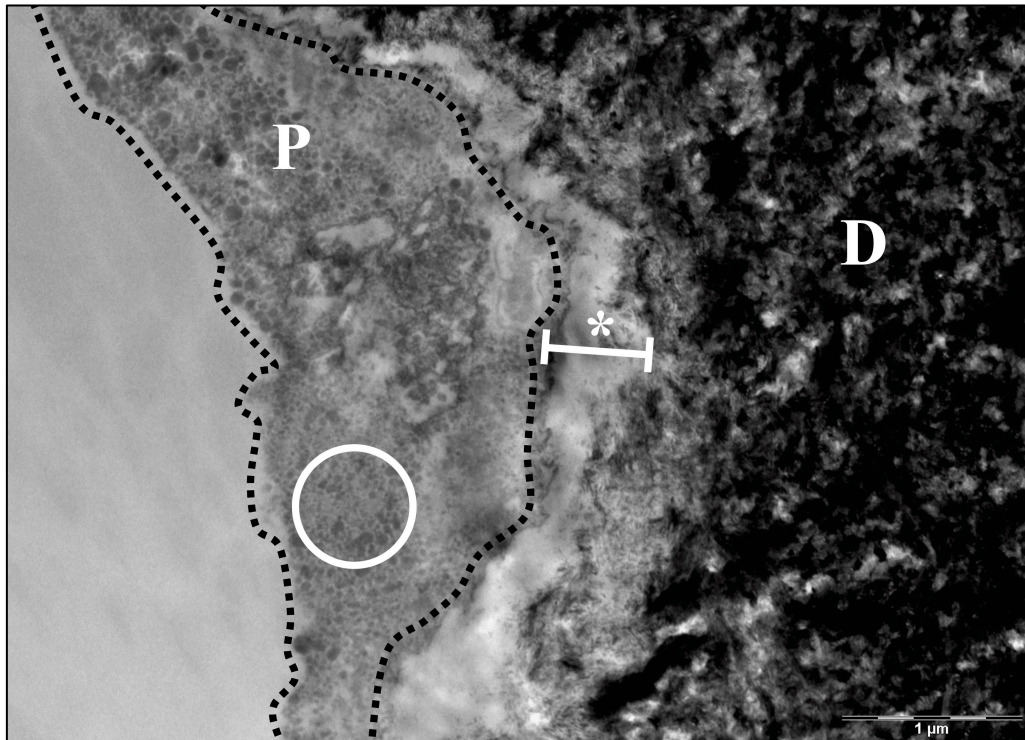


Abb. 29: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung und *in-vitro* Säureangriff. Die Aufnahme zeigt eine verdichtete Pellikel (P) mit globulärer und granulärer (Kreis) Morphologie. Daneben ist die Demineralisationszone (*) und das intakte Dentin (D) erkennbar. Vergrößerung: 18.500-fach; Längsbalken = 1000 nm

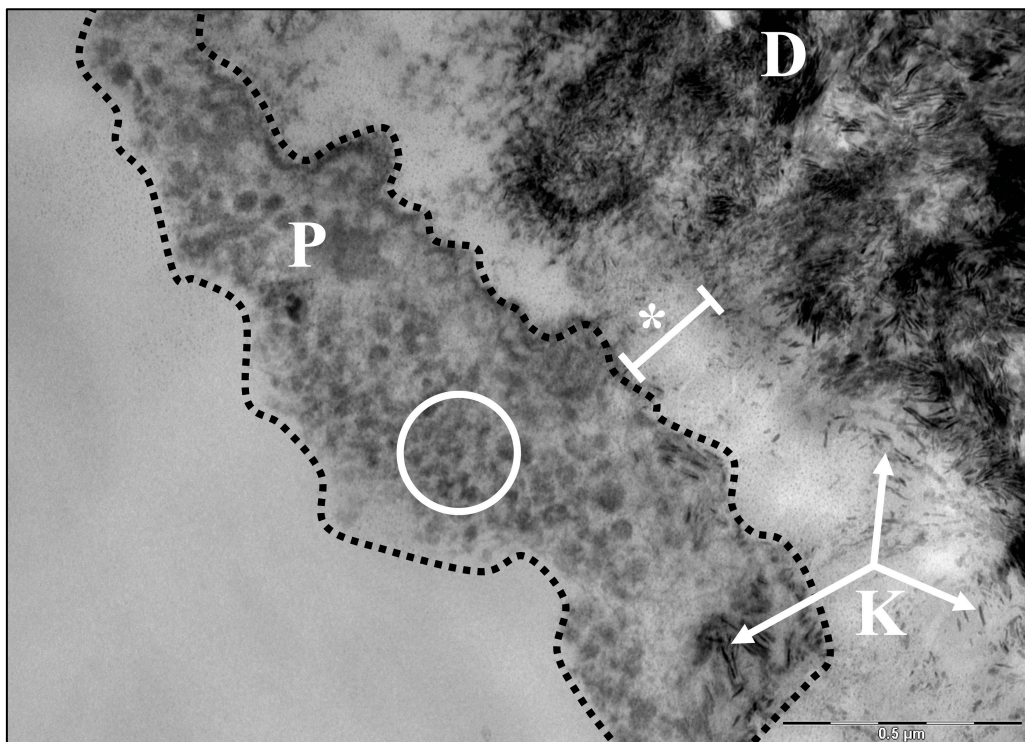


Abb. 30: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung und *in-vitro* Säureangriff. Die Aufnahme zeigt Proteinagglomerate (Kreis) in der Pellikel (P). Daneben ist die Demineralisationszone (*) mit nadelförmigen Hydroxylapatit-Kristalliten (K) zu erkennen. Einige Kristallite sind auch innerhalb der Pellikel sichtbar. D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 49.000-fach; Längsbalken = 500 nm

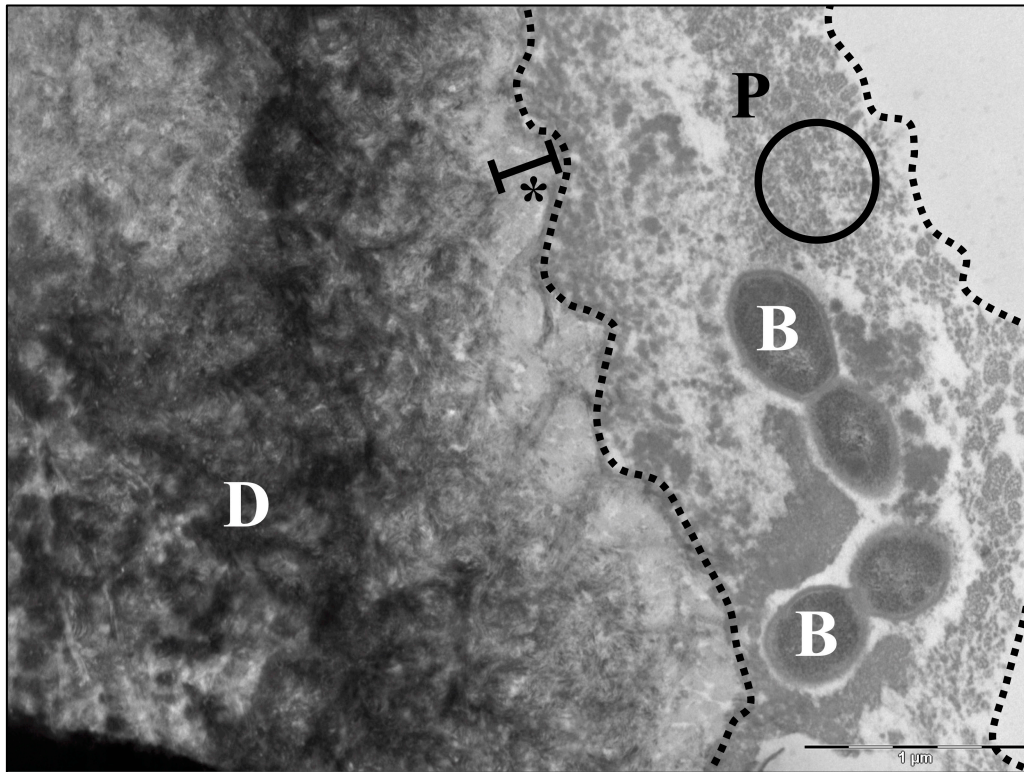


Abb. 31: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung und *in-vitro* Säureangriff. Es ist eine verdichtete Pellikel (P) mit Proteinagglomeraten (Kreis) erkennbar. Innerhalb der Pellikel sind Bakterien (B) eingebettet. D = intaktes Dentin; * = Demineralisationszone; Vergrößerung: 23.000-fach; Längsbalken = 1000 nm

4.3 Versuch III

4.3.1 Spülung mit 1%iger Hopfenlösung ohne *in-vitro* Säureangriff

Versuch III wurde mit 1%iger Hopfenlösung als Spüllösung durchgeführt. Die Präparate mit einer 3-minütigen Pellikelbildungszeit und Spülung mit 1%iger Hopfenlösung wiesen Pellikel mit unregelmäßigen Dicken von 0 nm bis 250 nm auf. Die Proteinagglomerate waren von granulärer Gestalt. Auch ohne expliziten Erosionsangriff konnte eine demineralisierte Dentschicht mit einer maximalen Breite von 600 nm dargestellt werden (Abb. 32 bis Abb. 34).

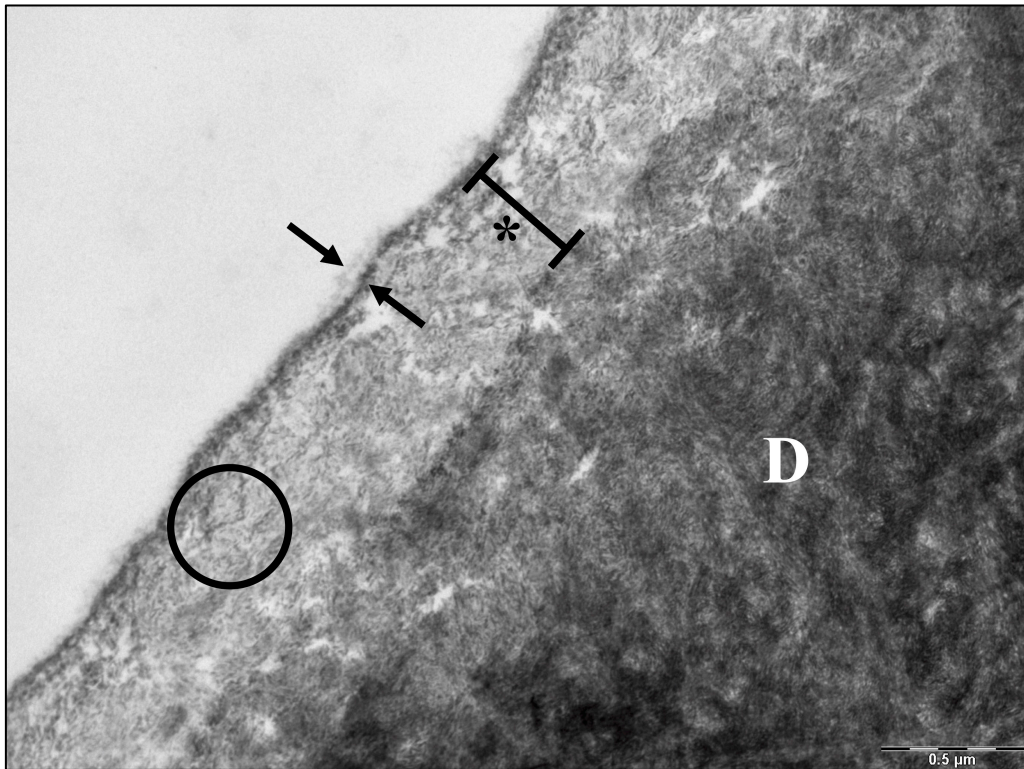


Abb. 32: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Hopfenlösung. Es ist eine Pellikel (Pfeile) mit elektronendichter Basisschicht an der Dentinoberfläche erkennbar. Innerhalb der Demineralisationszone (*) stellen sich dichte Ansammlungen von Hydroxylapatit-Kristalliten (Kreis) dar. D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 30.000-fach; Längensbalken = 500 nm

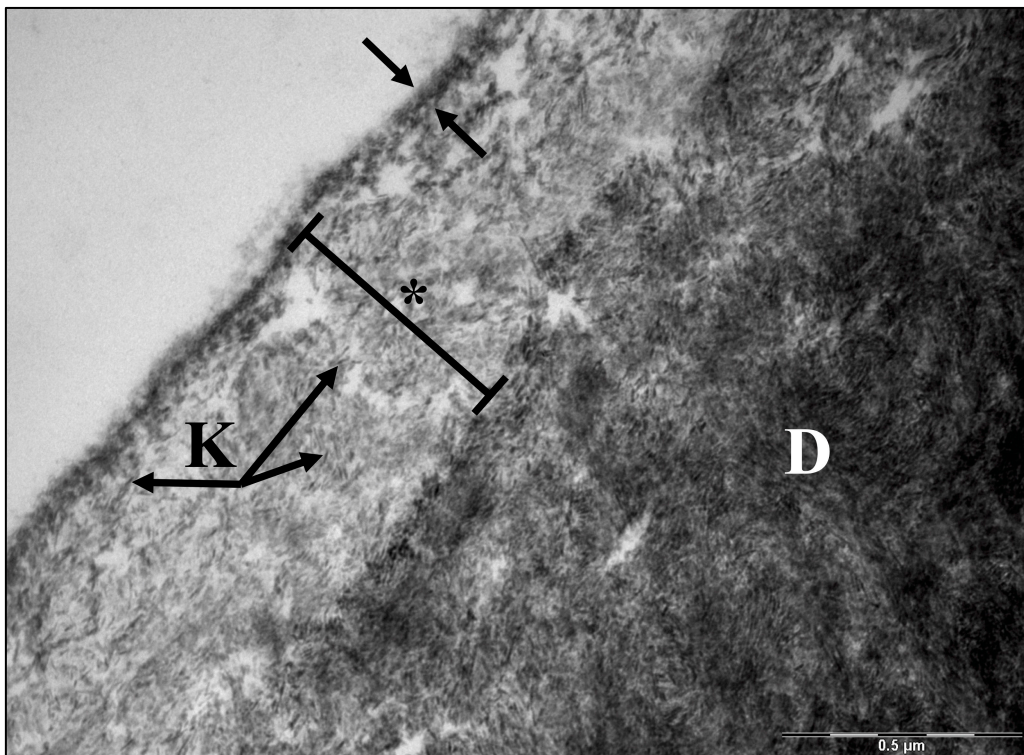


Abb. 33: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Hopfenlösung. Die in der Demineralisationszone (*) befindlichen Hydroxylapatit-Kristallite (K) haben eine nadelförmige Struktur. D = intaktes Dentin; Doppelpfeil = Pellikel; Vergrößerung: 49.000-fach; Längensbalken = 500 nm

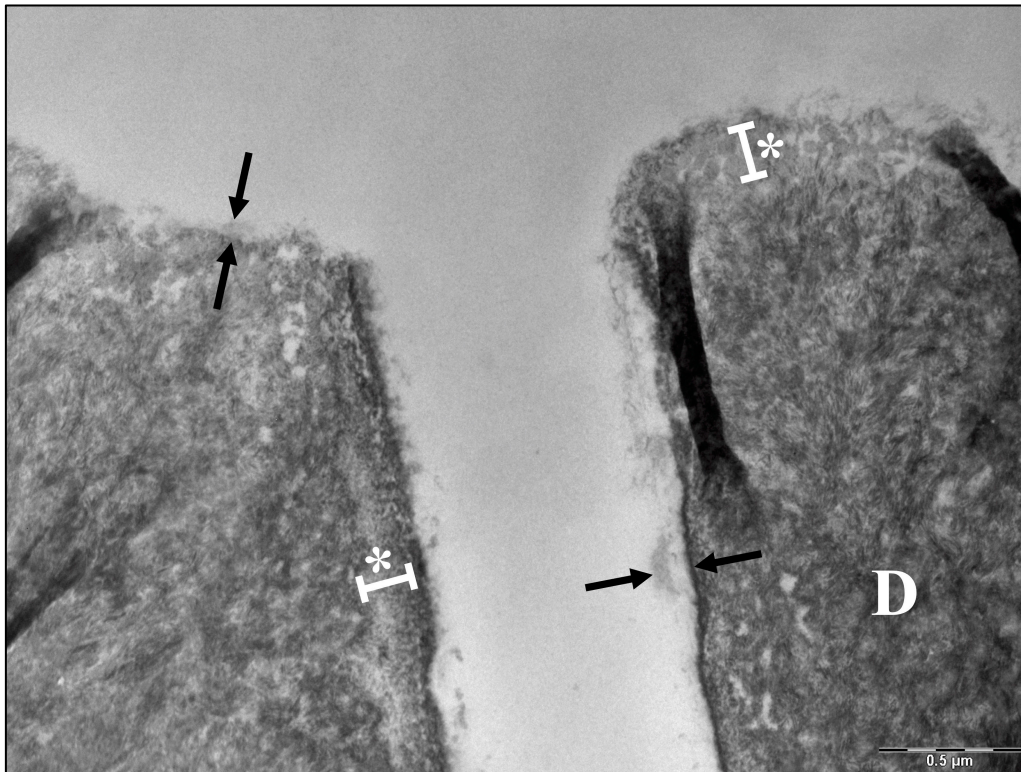


Abb. 34: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Hopfenlösung. Die Abbildung zeigt einen Tubuluseingang. Sowohl an der Dentinoberfläche, als auch an der Tubuluswand sind Proteinagglomerate (Pfeile) zu erkennen. Die Demineralisationszonen (*) sind nur schwach sichtbar. D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 30.000-fach; Längsbalken = 500 nm

Die Präparate mit einer 2-stündigen Pellikelbildungszeit und Spülung mit 1%iger Hopfenlösung wiesen eine durchgehende Pellikel mit einer Dicke von 100 nm bis 600 nm auf. Die Pellikel setzte sich aus einer elektronendichten Basisschicht mit darüberliegender, sowohl globulär als auch granulär strukturierter Pellikel zusammen. Auch hier konnte ohne Erosionsangriff eine demineralisierte Dentinschicht mit einer maximalen Breite von 500 nm dargestellt werden (Abb. 35 bis Abb. 37). Nadelförmige Hydroxylapatit-Kristallite konnten in den Demineralisationszonen dargestellt werden. Sie traten mit einer randomisierten Verteilung (Abb. 37) und teilweise in dichten Ansammlungen (Abb. 35) auf. Weiterhin zeigten die TEM-Aufnahmen stellenweise adhärente Bakterien (Abb. 36).

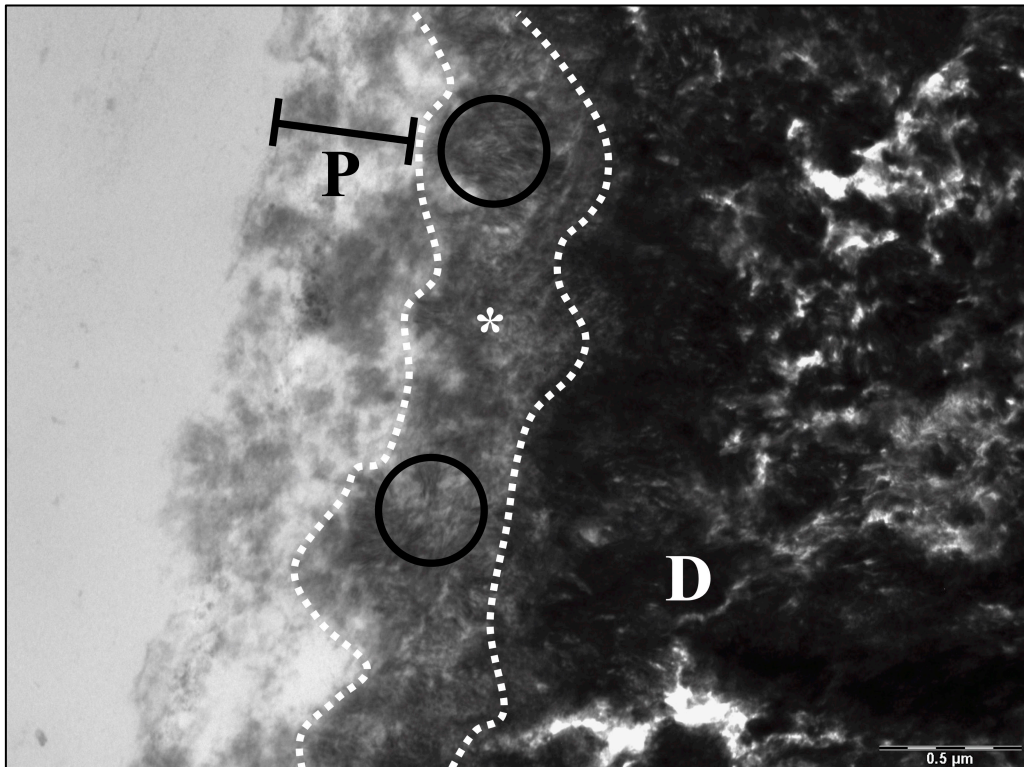


Abb. 35: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Hopfenlösung. Es ist eine Pellikel (P) mit globulär-granulärer Morphologie erkennbar. Die daran angrenzende Demineralisationszone (*) beinhaltet dichte Ansammlungen von Hydroxylapatit-Kristalliten (Kreis). D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 30.000-fach; Längsbalken = 500 nm

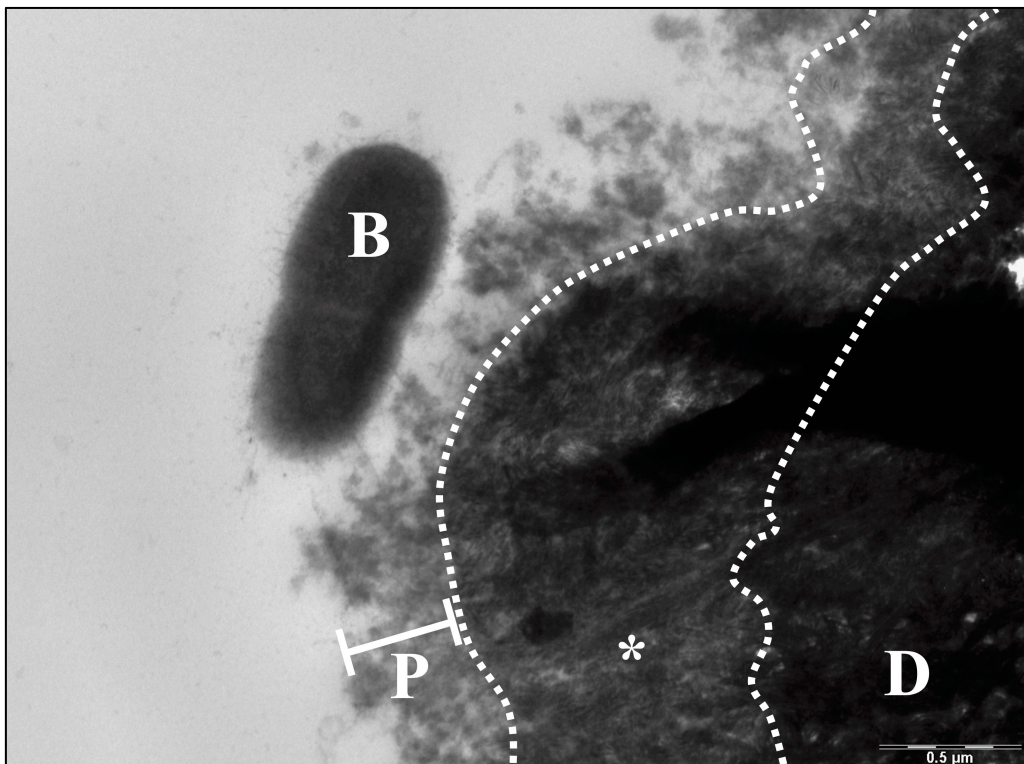


Abb. 36: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Hopfenlösung. Es ist eine verdichtete Pellicel (P) mit adhärenem Bakterium (B) erkennbar. D = intaktes Dentin; * = Demineralisationszone; Vergrößerung: 30.000-fach; Längsbalken = 500 nm

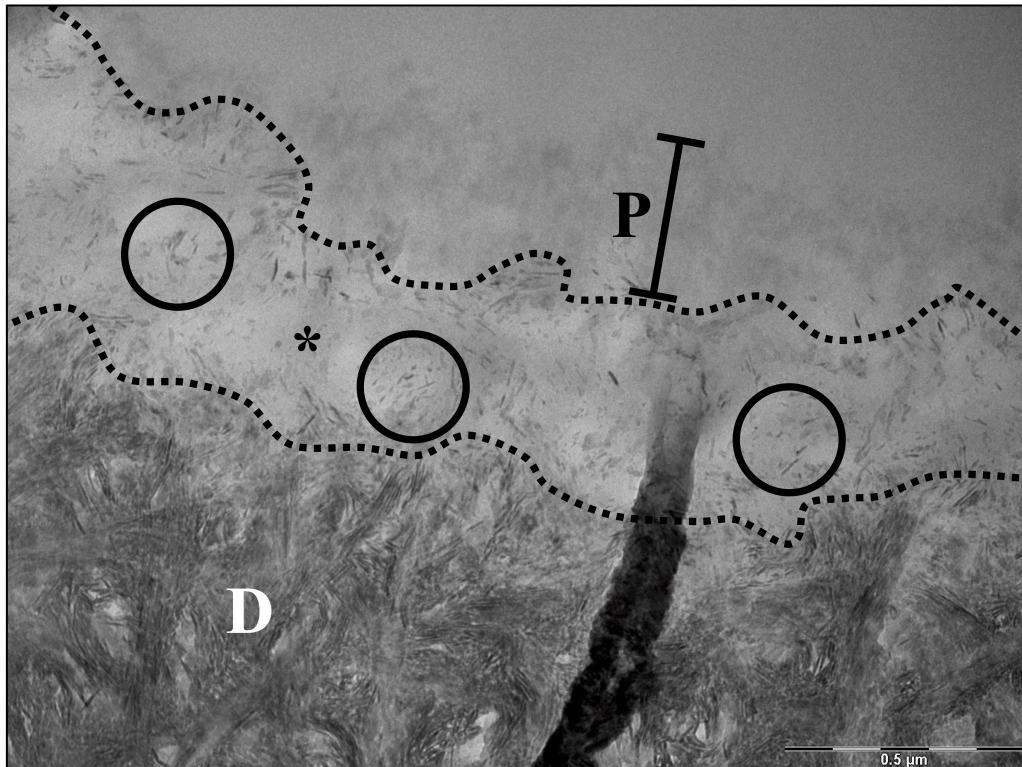


Abb. 37: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Hopfenlösung. Es ist eine weniger elektrodichte Pellicel (P) mit granulärer Morphologie erkennbar. Innerhalb der Demineralisationszone (*) zeigen sich viele einzelne, nadelförmige Hydroxylapatit-Kristallite mit unterschiedlicher Länge (Kreise). D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 49.000-fach; Längensbalken = 500 nm

4.3.2 Spülung mit 1%iger Hopfenlösung und *in-vitro* Säureangriff

Die Präparate mit Säureangriff nach 3-minütiger Pellicelbildungszeit und Spülung mit 1%iger Hopfenlösung wiesen ungleichmäßig verlaufende Pellicel mit Dicken von 0 nm bis 580 nm auf. Die Proteinagglomerate waren von granulärer Gestalt. Demineralisationszonen mit einer maximalen Tiefe von 1000 nm konnten dargestellt werden. Im Durchschnitt lag die Erosionstiefe jedoch bei 400 nm (Abb. 38 und Abb. 39). Hydroxylapatit-Kristallite konnten sowohl in der Demineralisationszone (Abb. 39), als auch in der Pellicel nachgewiesen werden (Abb. 38). Kristallitfreie Bereiche der Demineralisationszonen stellten sich wolkenartig mit freiliegenden Kollagenfibrillen dar (Abb. 38 und Abb. 39).

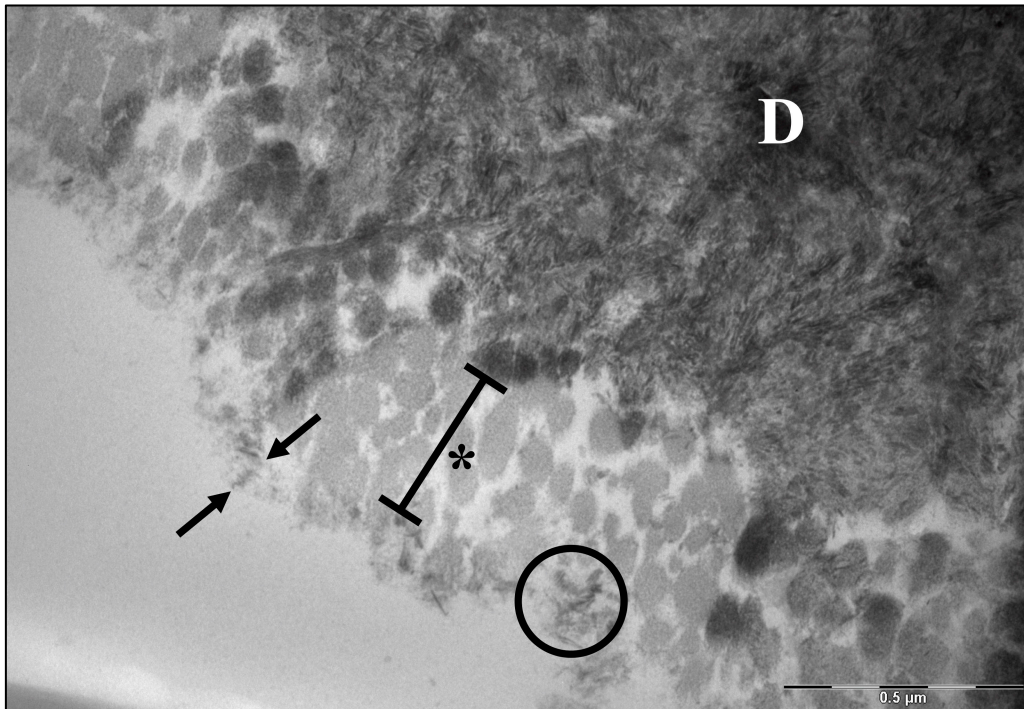


Abb. 38: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Hopfenlösung und *in-vitro* Säureangriff. Es ist eine Pellikel (Pfeile) mit einzelnen Hydroxylapatit-Kristalliten (Kreis) an der Dentinoberfläche zu erkennen. Die wolkenartig strukturierte Demineralisationszone (*) besteht aus einem Kollagenfibrillen-Netzwerk. D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 49.000-fach; Längenskalen = 500 nm

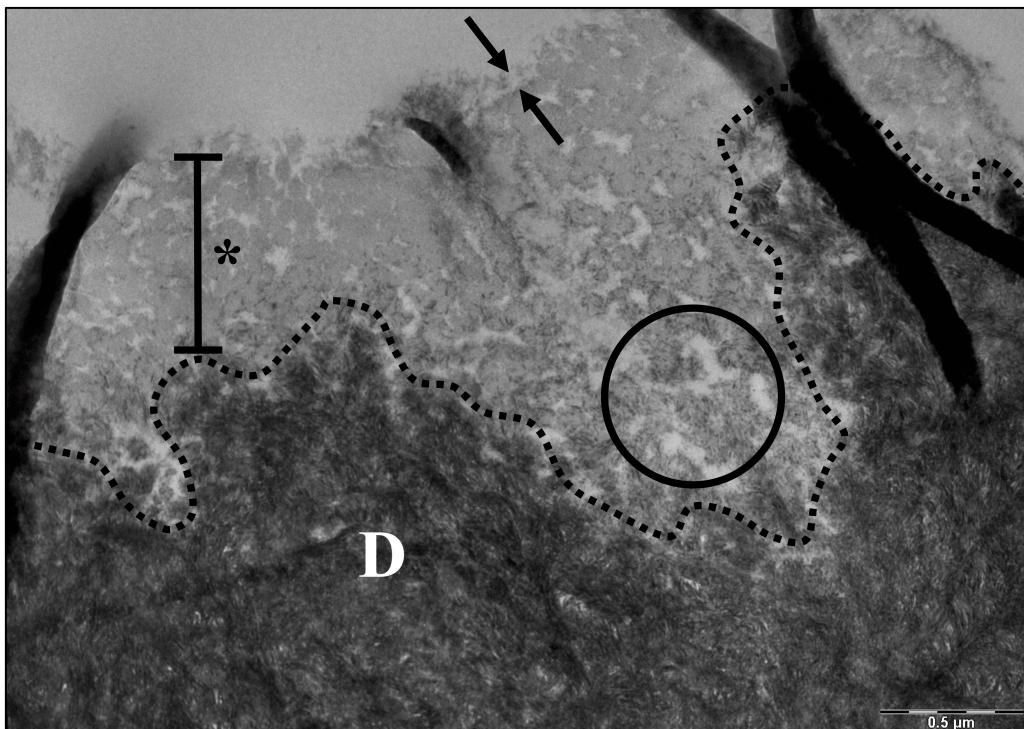


Abb. 39: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Hopfenlösung und *in-vitro* Säureangriff. Eine dünne Pellikel (Pfeile) ist an der Dentinoberfläche zu erkennen. Die Demineralisationszone (gestrichelte Linie) besteht aus einer superfiziellen Schicht mit freiliegendem Kollagenfibrillen-Netzwerk (*) und einer tieferliegenden Schicht mit präzipitierten, elektronendichten Hydroxylapatit-Kristalliten (Kreis). D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 30.000-fach; Längenskalen = 500 nm

Die Präparate mit Säureangriff nach 2-stündiger Pellikelbildungszeit und Spülung mit 1%iger Hopfenlösung wiesen stets eine kontinuierlich verlaufende Pellikel mit einer Dicke von bis zu 1200 nm auf. Die Pellikel setzte sich aus einer elektronendichten Basisschicht mit darüberliegender sowohl globulär als auch granulär strukturierter Pellikel zusammen. Eine durchschnittlich ca. 300 nm breite Demineralisationszone mit einer maximalen Breite von 800 nm konnte dargestellt werden (Abb. 40 und Abb. 41).

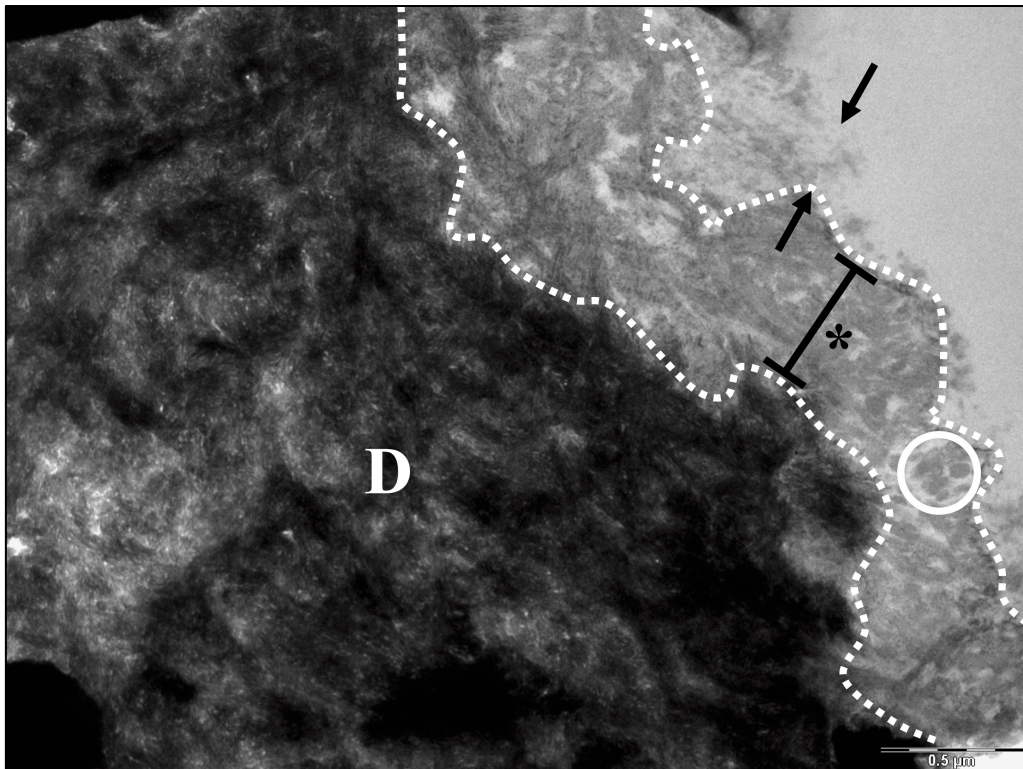


Abb. 40: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Hopfenlösung und *in-vitro* Säureangriff. Eine Pellikel (Pfeile) mit niedriger Elektronendichte ist an der Dentinoberfläche zu erkennen. Kollagenfibrillen (Kreis) sind aufgrund der ausgeprägten Erosion innerhalb der Demineralisationszone (*) sichtbar. D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 30.000-fach; Längenskalen = 500 nm

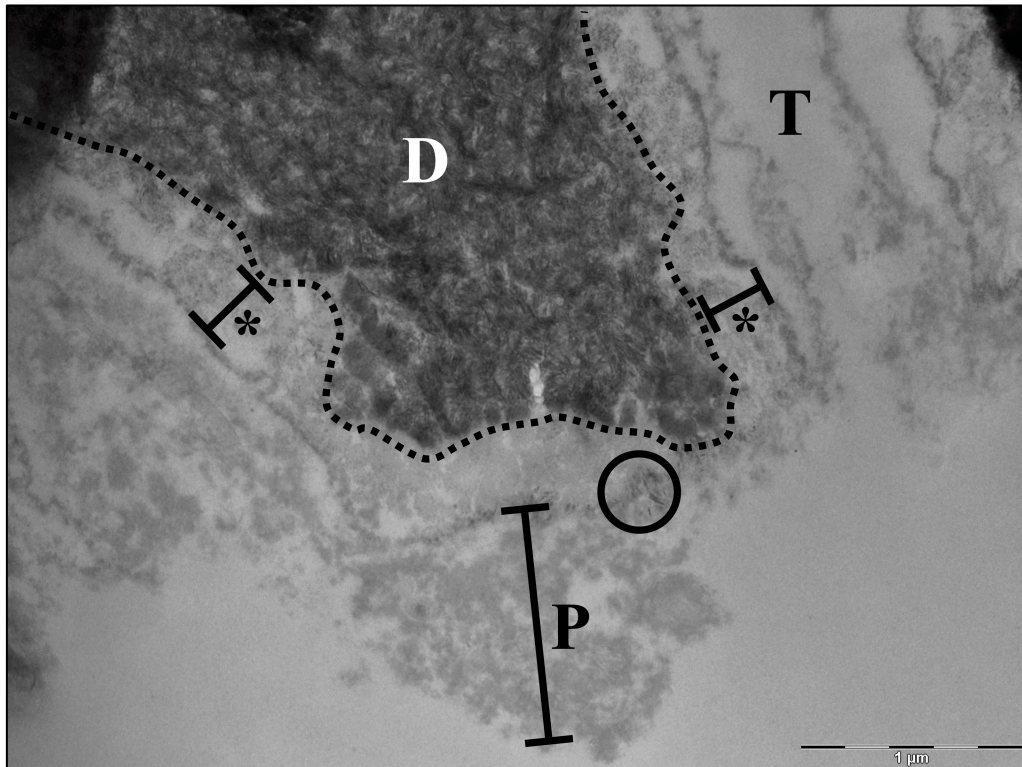


Abb. 41: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Hopfenlösung und *in-vitro* Säureangriff. Eine breite Pellikel (P) mit granulär-globulärer Morphologie ist an der Dentinoberfläche zu erkennen. Die Demineralisationszone (*) erstreckt sich über die gesamte Dentinberfläche und die Tubuluswände. D = intaktes Dentin; T = Dentintubulus; Vergrößerung: 23.000-fach; Längenskalen = 1000 nm

4.4 Versuch IV

4.4.1 Spülung mit Elmex Zahnschmelz Professional ohne *in-vitro* Säureangriff

Versuch IV wurde mit EZP als Spüllösung durchgeführt. Die Präparate mit einer 3-minütigen Pellikelbildungszeit und Spülung mit EZP wiesen vorwiegend unregelmäßig verlaufende Pellikel mit Dicken von 0 nm bis 250 nm auf. Die Proteinagglomerate waren von granulärer Morphologie (Abb. 42 bis Abb. 44).

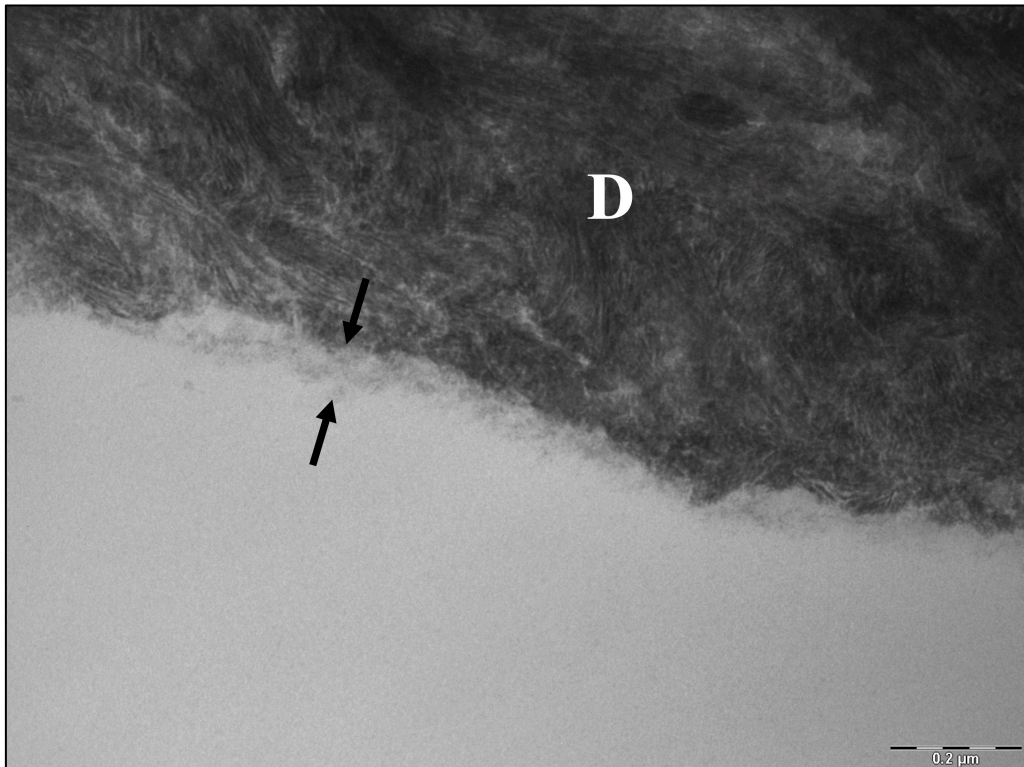


Abb. 42: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit Elmex Zahnschmelz Professional. Eine kontinuierlich verlaufende Pellikel (Pfeile) mit niedriger Elektronendichte ist an der Dentinoberfläche (D) erkennbar. Vergrößerung: 68.000-fach; Längenbalken = 200 nm

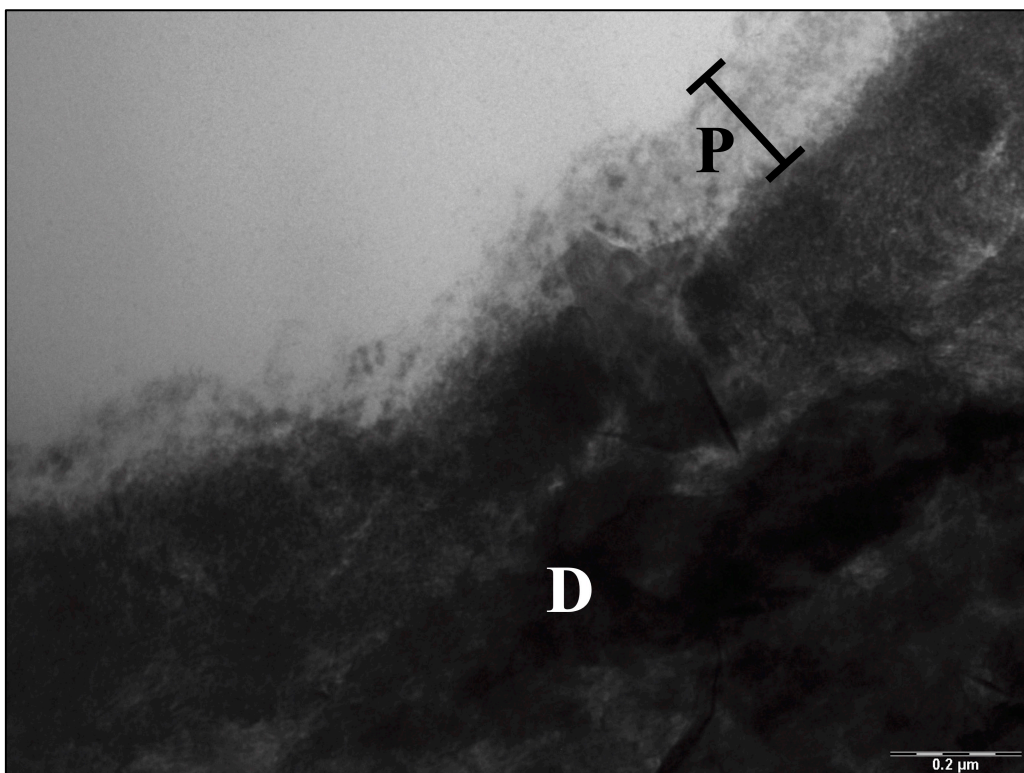


Abb. 43: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit Elmex Zahnschmelz Professional. In der Pellikel (P) sind vereinzelt elektronendichte Proteinagglomerate erkennbar. D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 68.000-fach; Längenbalken = 200 nm

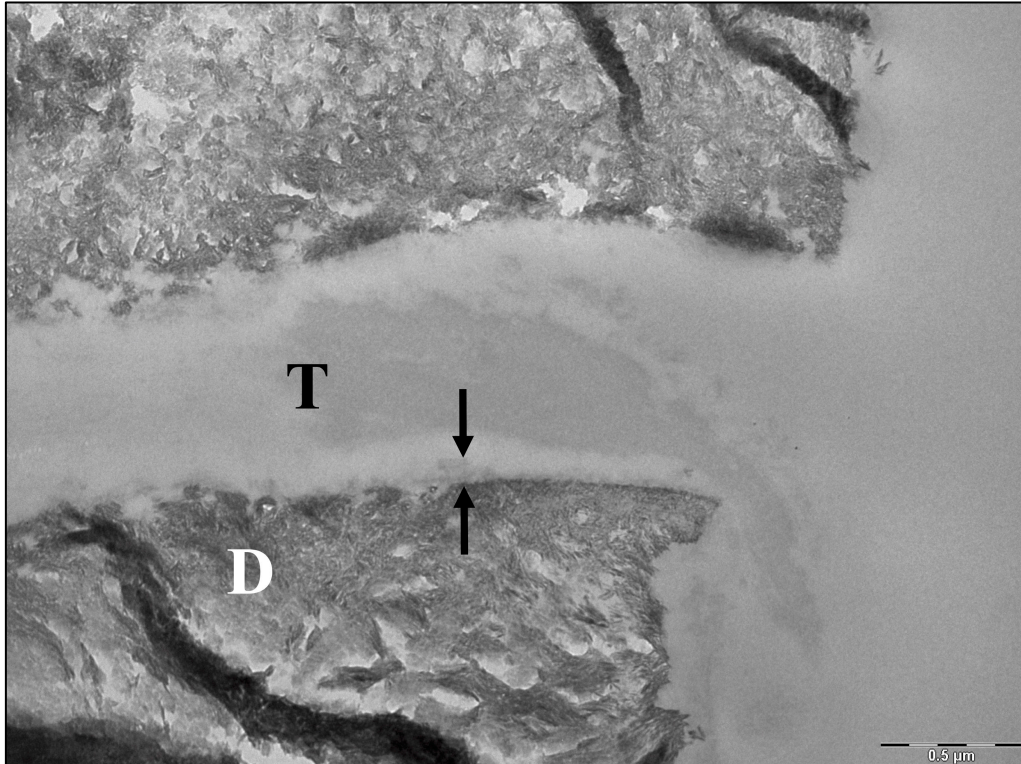


Abb. 44: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit Elmex Zahnschmelz Professional. Die Abbildung zeigt einen Tubuluseingang (T). Die Tubuluswände sind teilweise von einer dünnen Pellicel mit elektronendichter Basisschicht (Pfeile) ausgekleidet. Das Dentin (D) erscheint mit typischer Morphologie. Vergrößerung: 30.000-fach; Längsbalken = 500 nm

Die Präparate mit einer 2-stündigen Pellicelbildungszeit und Spülung mit EZP wiesen kontinuierlich verlaufende Pellicel mit Dicken von bis zu 800 nm auf (Abb. 45 bis Abb. 47). Tubuluseingänge waren vereinzelt von einem Pellicelpfropf bedeckt (Abb. 46). Die Pellicel setzte sich aus einer elektronendichten Basisschicht mit darüberliegenden sowohl globulär als auch granulär strukturierten Agglomeraten zusammen (Abb. 45 und Abb. 46). Auch hier konnten vereinzelt auftretende Bakterien, die in der Pellicel eingebettet waren, dargestellt werden (Abb. 47).

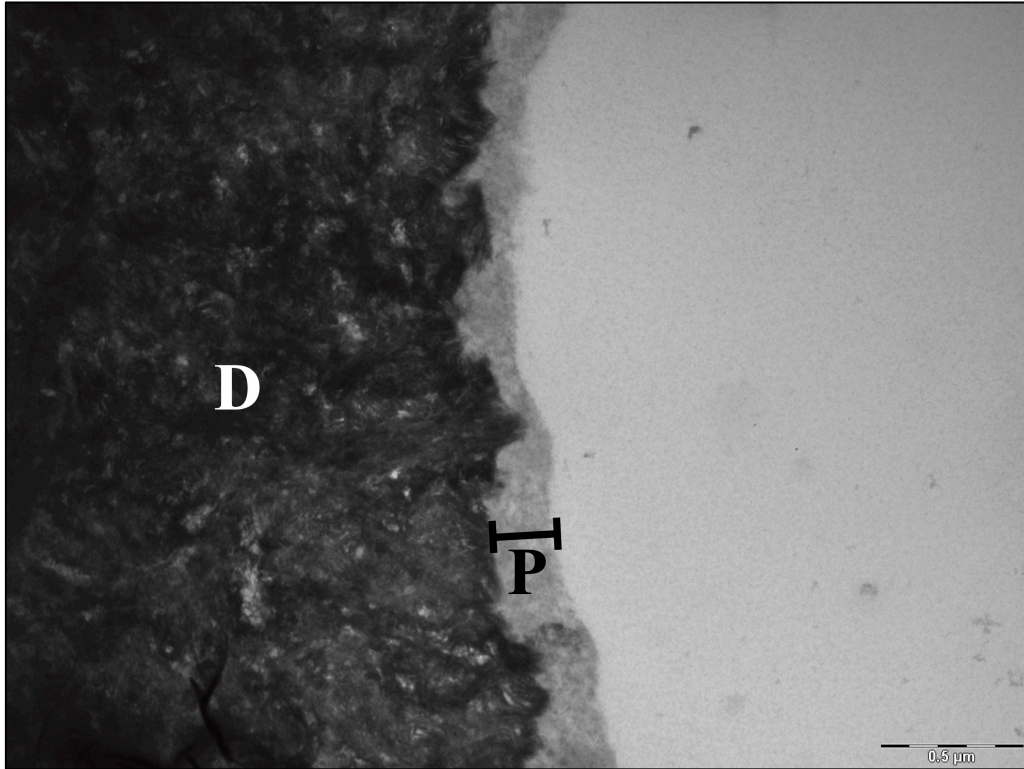


Abb. 45: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit Elmex Zahnschmelz Professional. Die Abbildung zeigt eine dichte, homogen strukturierte Pellikel (P) auf Dentin (D). Vergrößerung: 30.000-fach; Längenbalken = 500 nm

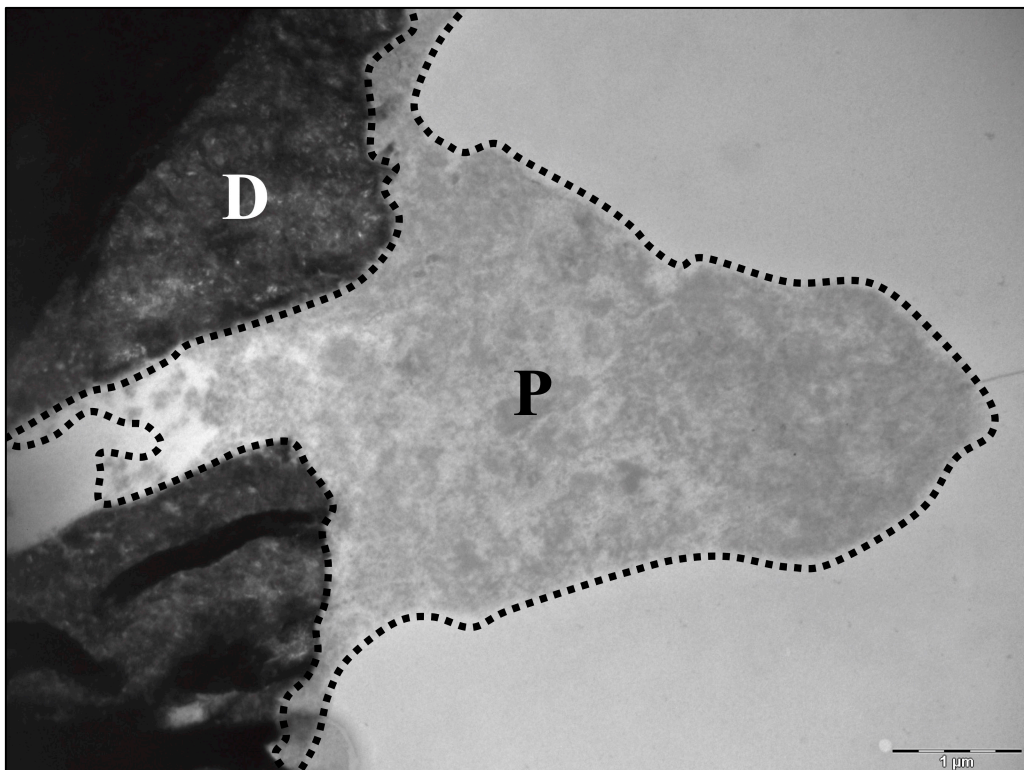


Abb. 46: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit Elmex Zahnschmelz Professional. Die Abbildung zeigt einen Tubuluseingang der durch einen großen Pellikelpfropf (P) verschlossen ist. D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 13.000-fach; Längenbalken = 1000 nm

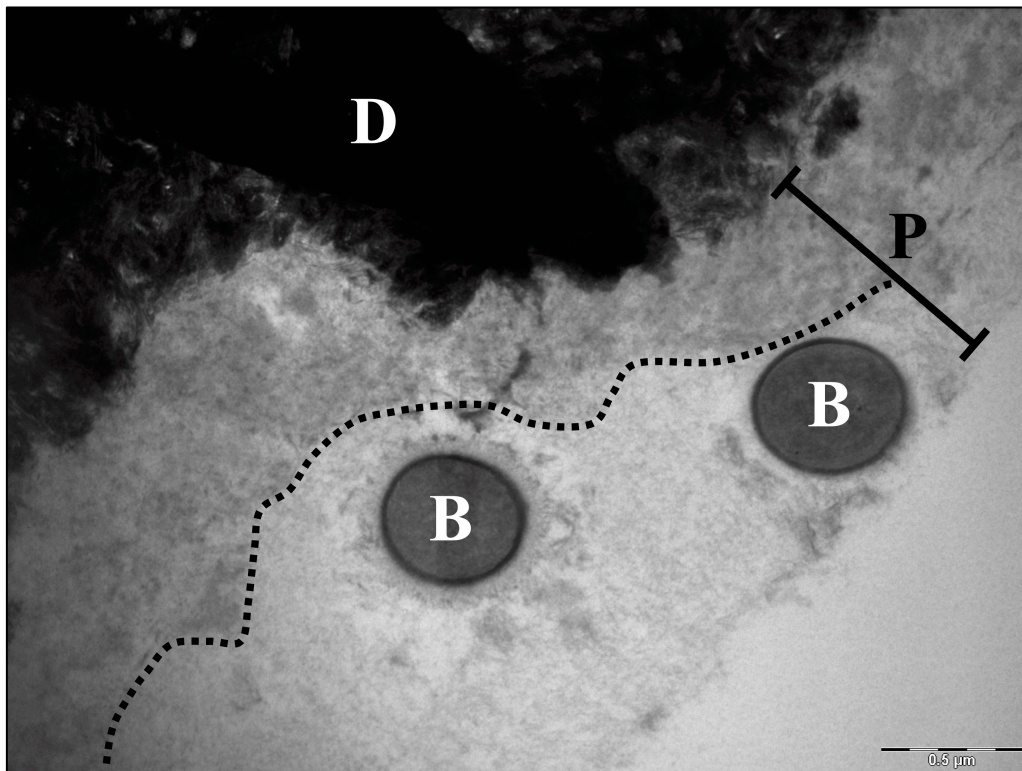


Abb. 47: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit Elmex Zahnschmelz Professional. Es ist eine zweischichtige Pellikel (P) mit einer tiefen dichten Schicht und einer darüberliegenden, schwächer elektronendichten Schicht erkennbar. In der äußeren Schicht sind zwei Bakterien eingebettet (B). D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 30.000-fach; Längsbalken = 500 nm

4.4.2 Spülung mit Elmex Zahnschmelz Professional und *in-vitro* Säureangriff

Die Präparate mit Säureangriff nach 3-minütiger Pellikelbildungszeit und Spülung mit EZP wiesen eine lose strukturierte Pellikel mit unregelmäßigen Dicken von bis zu 300 nm auf. Die Proteinagglomerate waren größtenteils von granulärer Morphologie (Abb. 48 und Abb. 49). Demineralisationszonen mit einer maximalen Breite von 200 nm konnten sowohl an der Dentinoberfläche (Abb. 48), als auch an den Tubuluswänden dargestellt werden (Abb. 49). Demineralisationen an der Dentinoberfläche waren, im Gegensatz zu Demineralisationen der Tubuluswände, nur selten zu sehen und durch Anhäufung von Hydroxylapatit-Kristalliten stellenweise unterbrochen (Abb. 48). Einzelne Bakterien waren bereits in der 3min-Pellikel existent (Abb. 49).

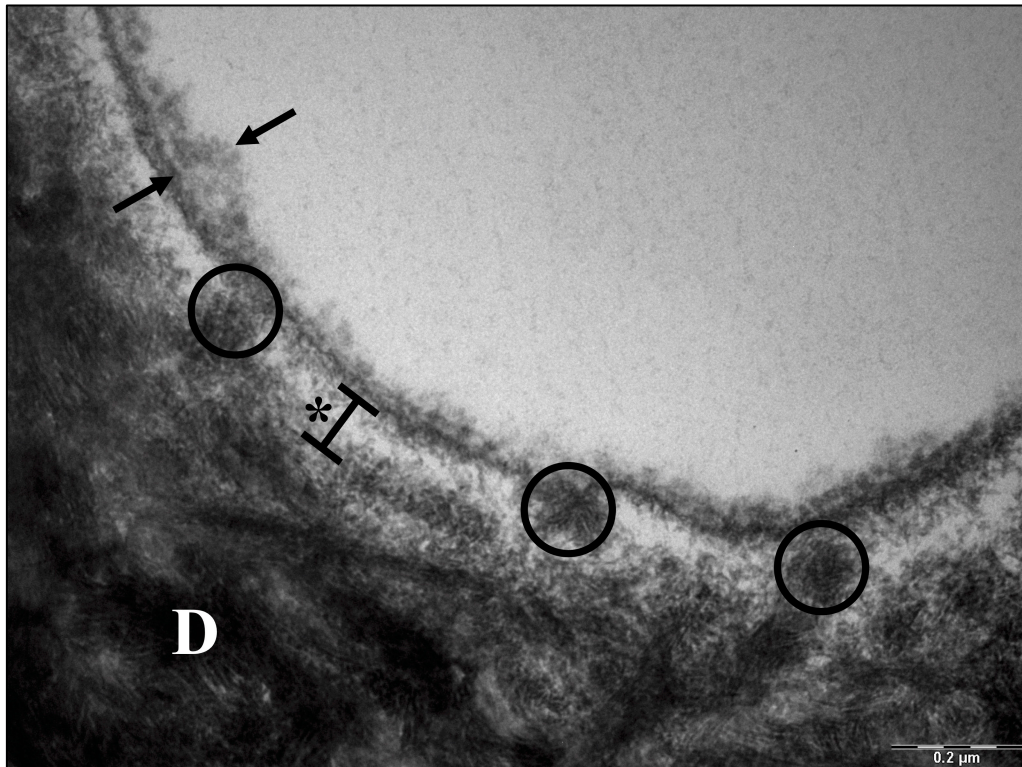


Abb. 48: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit Elmex Zahnschmelz Professional und *in-vitro* Säureangriff. Die Abbildung zeigt eine granulär strukturierte Pellikel (Pfeile) an der Dentinoberfläche. Die schmale Demineralisationszone (*) ist an drei Stellen durch Anhäufungen von Hydroxylapatit-Kristalliten (Kreis) unterbrochen. Hierbei handelt es sich möglicherweise um eine Demineralisation unterhalb einer pseudointakten Oberfläche („subsurface lesion“), da die darüberliegende Dentinschicht intakt zu sein scheint. D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 68.000-fach; Längsbalken = 200 nm

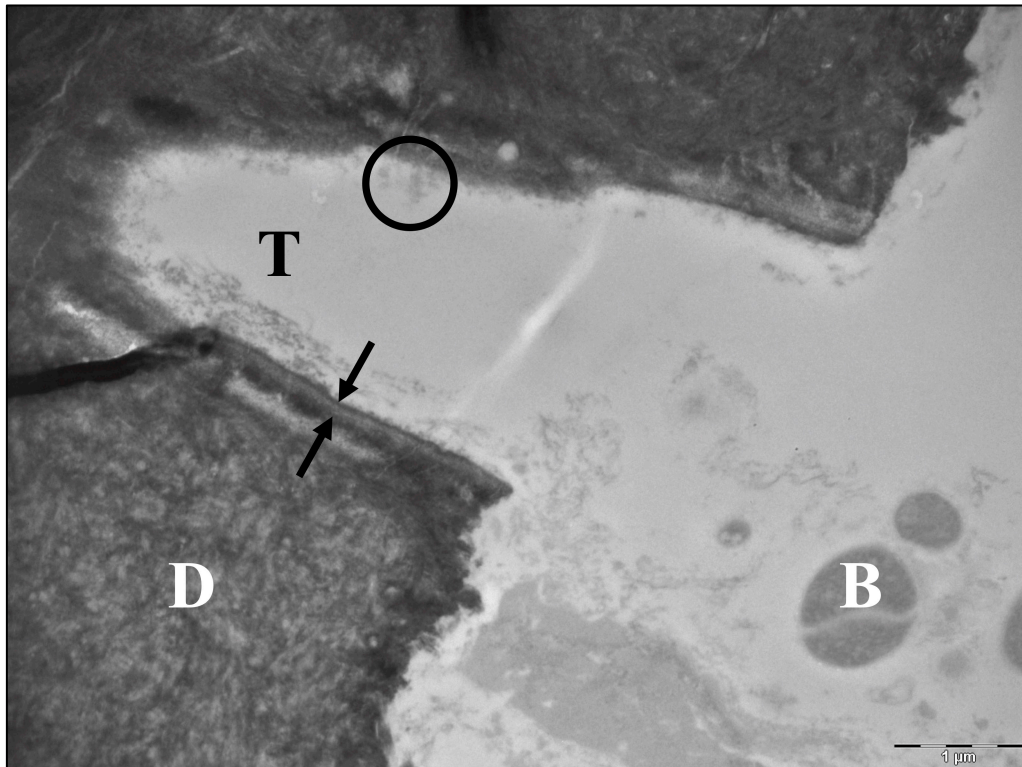


Abb. 49: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit Elmex Zahnschmelz Professional und *in-vitro* Säureangriff. Die Abbildung zeigt einen angeschnittenen Dentintubulus (T). An der Dentinoberfläche und den Tubuluswänden befinden sich lose strukturierte Proteinagglomerate (Kreis). Eine dünne Demineralisationszone (Pfeile) ist lediglich im Bereich der Tubuluswand erkennbar, jedoch nicht an der eigentlichen Dentinoberfläche. Nahe der Dentinoberfläche sind Bakterien (B) eingebettet. D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 13.000-fach; Längsbalken = 1000 nm

Die Präparate mit Säureangriff nach 2-stündiger Pellikelbildungszeit und Spülung mit EZZP wiesen eine kontinuierlich verlaufende Pellikel mit einer Dicke von bis zu 800 nm auf. Die Pellikel setzte sich aus einer elektronendichten Basisschicht und darüberliegenden weniger elektronendichten globulären und granulären Strukturen zusammen (Abb. 50 und Abb. 51). Keiner der in dieser Gruppe untersuchten Dünnschnitte wies Demineralisationszonen an der PK-Oberfläche auf. Demineralisationen kamen lediglich im Bereich der Tubuluswände vor (Abb. 51).

Die Demineralisationszonen im Bereich der Prüfkörperoberfläche waren nach Spülung mit EZZP in den Versuchen mit einer 3min-Pellikel deutlich schmaler im Vergleich zu äquivalenten Versuchsgruppen, die mit anderen Spüllösungen behandelt wurden. Für die Gruppe mit EZZP-modifizierten 2h-Pellikel konnten lediglich Demineralisationen an den Tubuluswänden, jedoch nicht an den Prüfkörperoberflächen wie in äquivalenten Versuchen mit anderen Spüllösungen beobachtet, dargestellt werden. Daraus lässt sich ein deutlich erkennbarer Erosionsschutz durch Spülung mit EZZP ableiten.

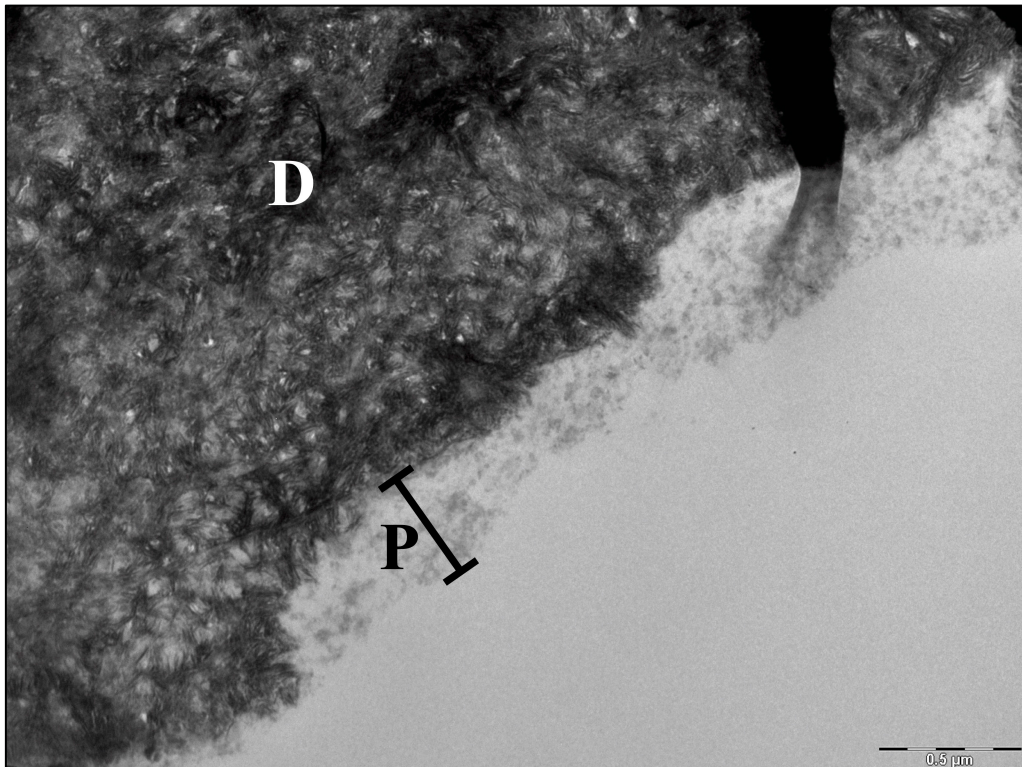


Abb. 50: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit Elmex Zahnschmelz Professional und *in-vitro* Säureangriff. Die Abbildung zeigt eine annähernd homogen strukturierte Pellikel (P) an der Dentinoberfläche. D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 30.000-fach; Längsbalken = 500 nm

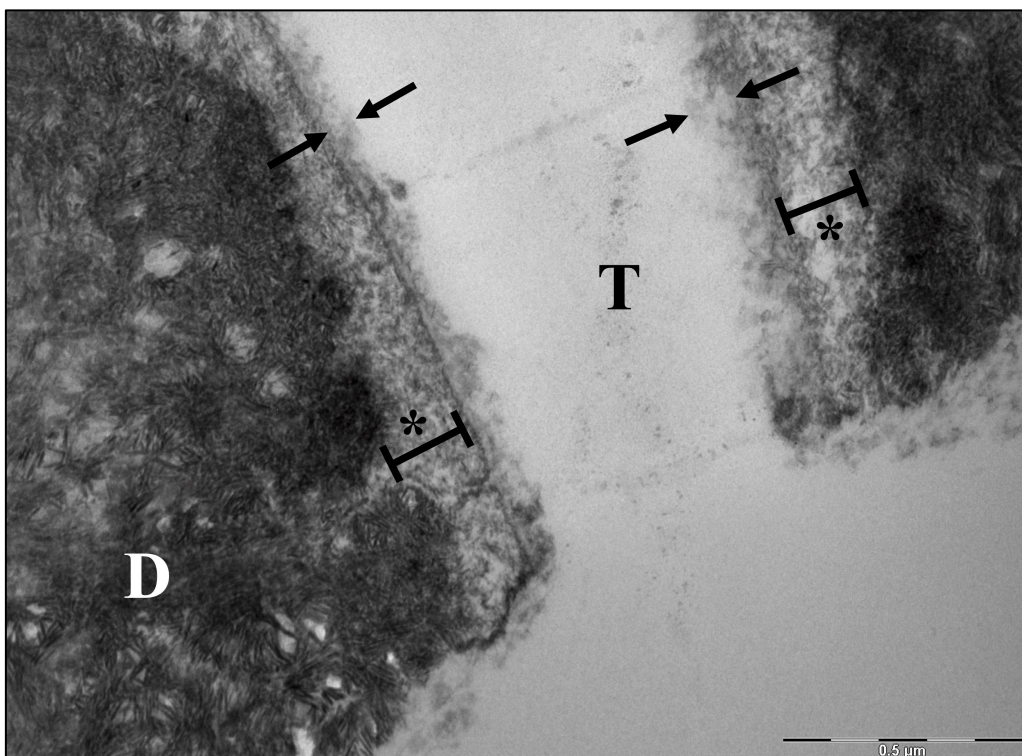


Abb. 51: 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit Elmex Zahnschmelz Professional und *in-vitro* Säureangriff. Die Abbildung zeigt einen Tubuluseingang (T) mit demineralisierten Tubuluswänden (*). Die Tubuluswände und die eigentliche Dentinoberfläche sind von einer Pellikel (Pfeile) bedeckt. D = intaktes Dentin; Vergrößerung: 49.000-fach; Längsbalken = 500nm

4.5 Schematische Darstellung des Erosionsprozesses

Im ersten Schritt des *in-vitro*-Säureangriffs durchdringt das Erosionsagens (in Abb. 52 symbolisch mit H^+ dargestellt) die Pellikel und erreicht die Dentinoberfläche. Anschließend kann es die Dentintubuli penetrieren und durch das Dentin diffundieren (Abb. 52c). Erst dadurch ist eine Demineralisation des oberflächlichen Dentins und der Tubuluswände möglich. Während des Erosionsprozesses können die anorganischen Dentinbestandteile (Hydroxylapatit-Kristallite) zerfallen oder sich aus dem Kollagengeflecht lösen. Die Kristallite können dadurch an verschiedenen Stellen innerhalb der Demineralisationszone (Abb. 52d) präzipitieren. Dies geschieht überwiegend am Grenzbereich zwischen Demineralisationszone und Pellikel sowie im Grenzbereich zwischen intaktem und demineralisiertem Dentin (Abb. 52e und Abb. 53). Auch ein Übergang in die Pellikel ist möglich (Abb. 52e und Abb. 53). Im mittleren Bereich der Demineralisationszonen sind häufig keine Kristallite mehr erkennbar. Dies führt an diesen Stellen zur vollständigen Demaskierung des Kollagennetzwerkes (Abb. 52e).

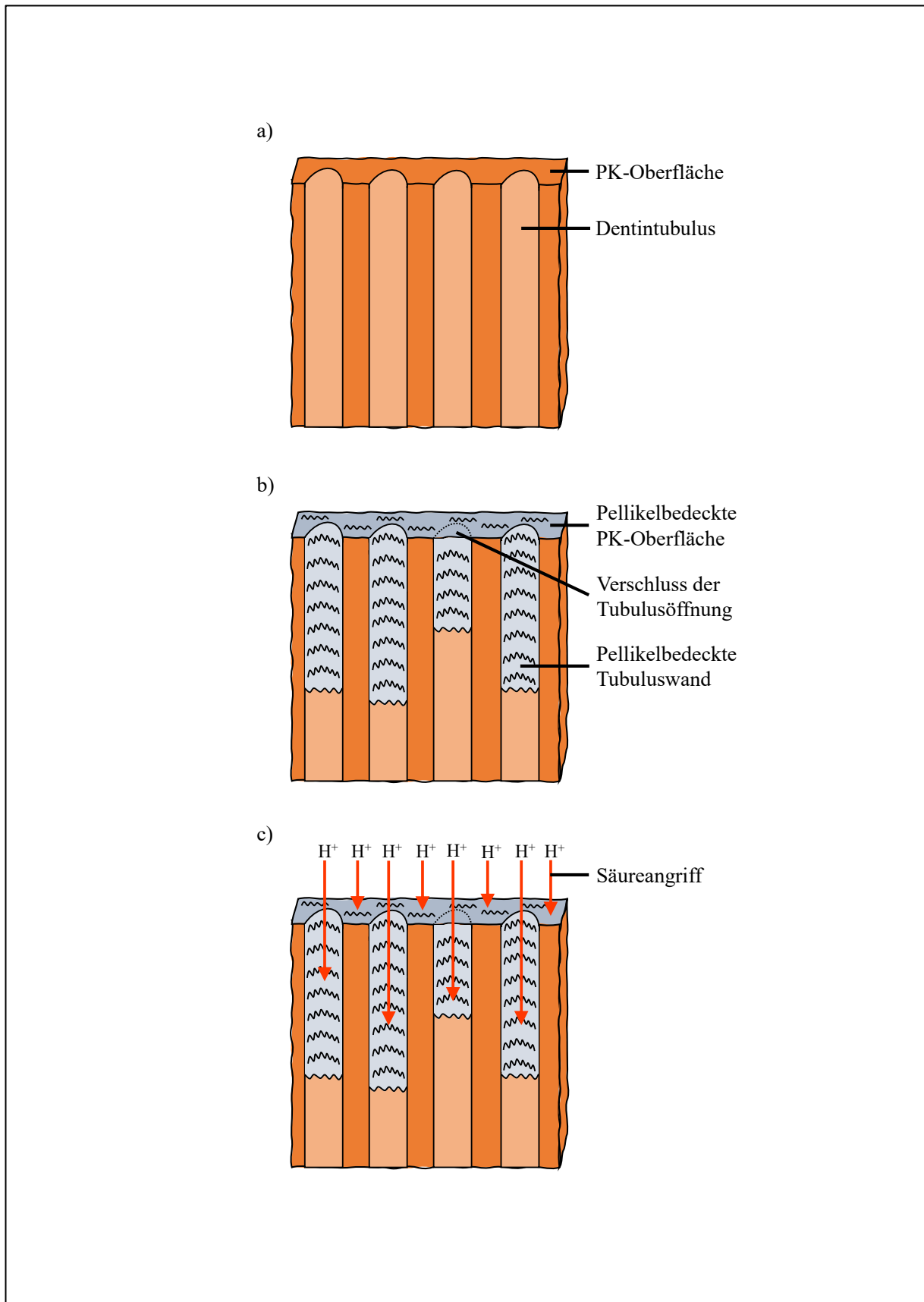


Abb. 52 a-c: Schemazeichnung des Demineralisationsprozesses. a) Dentinprüfkörper im Längsschnitt b) Pellikelbildung auf der Prüfkörperoberfläche und Tubuluswänden c) Erosion des pellikelbedeckten Dentinprüfkörpers. PK = Prüfkörper, H^+ = Säure

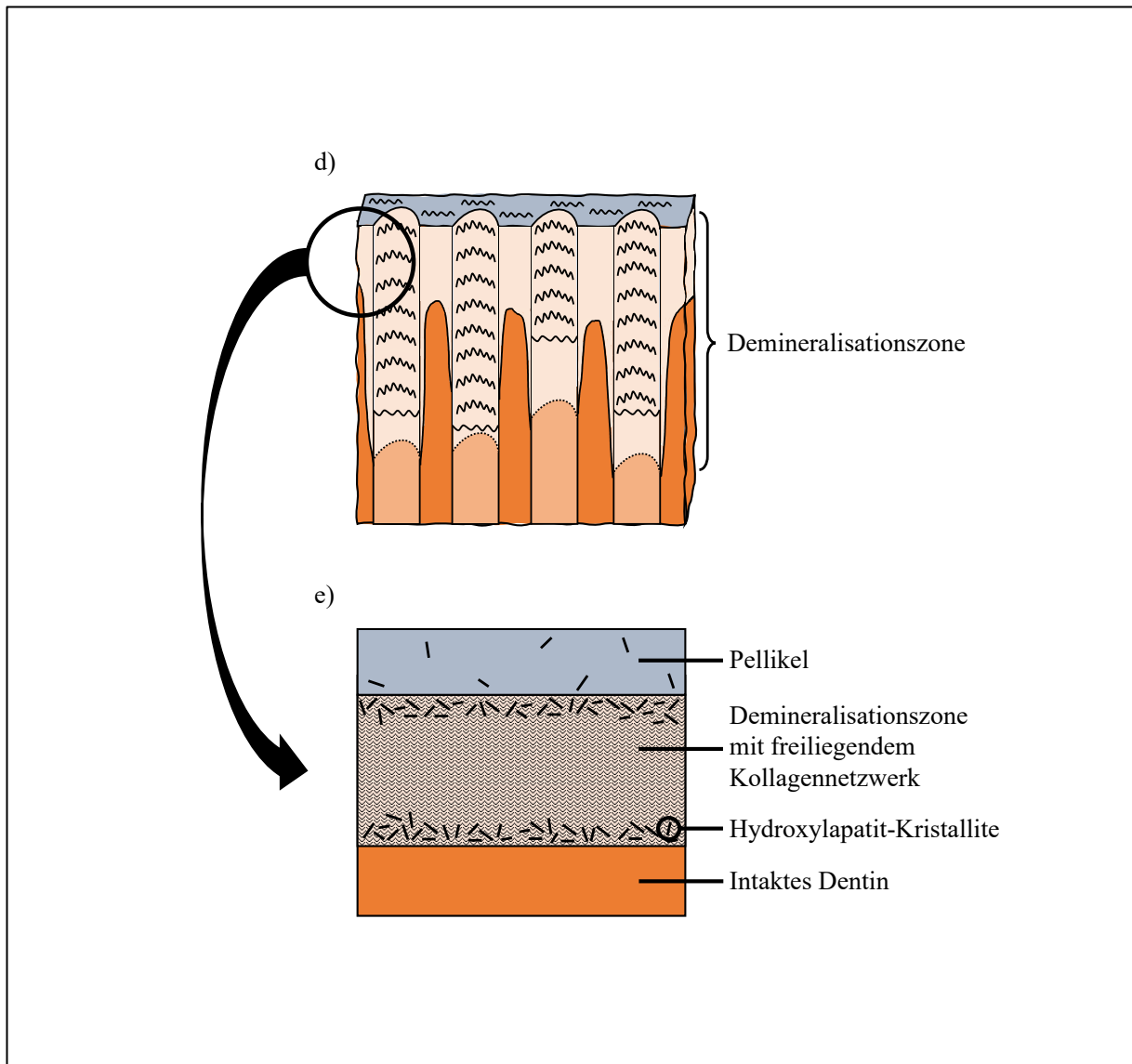


Abb. 52 d-e: Schemazeichnung des Demineralisationsprozesses. d) Entstehung einer Demineralisationszone mit Ausläufern im Bereich der Tubuli e) Demineralisationszone mit freiliegendem Kollagennetzwerk und präzipitierten Hydroxylapatit-Kristalliten im Detail

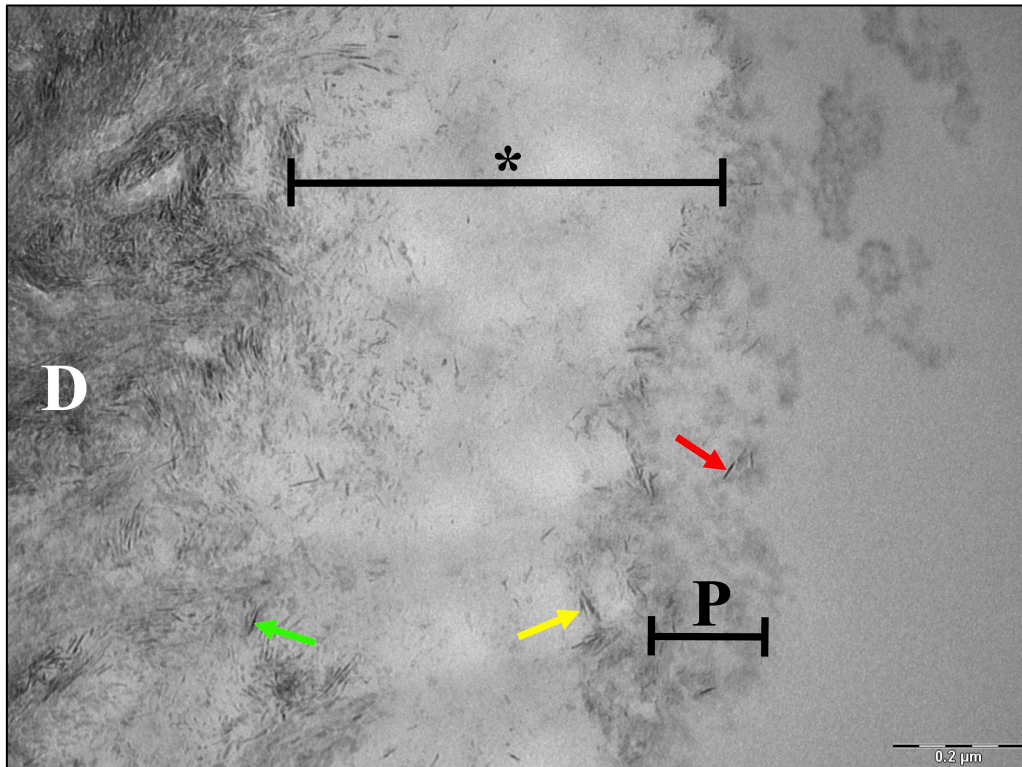


Abb. 53: 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit 1%iger Tanninsäurelösung und *in-vitro* Säureangriff. Man sieht die Dentinoberfläche (D) mit einer ausgeprägten Demineralisationszone (*). Die Pfeile zeigen auf nadelförmige Hydroxylapatit-Kristallite innerhalb der Pellikel (P, rot) und der Demineralisationszone (*, gelb und grün). Vergrößerung: 68.000-fach; Längsbalken = 200 nm

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Studiendesign und Probanden

In der vorliegenden Studie wurden die Effekte verschiedener Spüllösungen auf die Dentinpelikel miteinander verglichen. Hierfür wurde folgendes Studiendesign gewählt: Das Versuchsprotokoll gliederte sich in vier Phasen, in denen je eine Spüllösung zum Einsatz kam. Jeder Proband partizipierte an sämtlichen Versuchen. Zwischen den Phasen wurden zeitliche Abstände von mindestens 5 Tagen eingehalten, um die Auswaschung der Substanzen innerhalb der Mundhöhle (sog. Wash-Out-Zeit) zu gewährleisten und Überhangseffekte zu vermeiden. Die Spülzeit betrug 30 Sekunden, was der Spülzeit von handelsüblichen Spüllösungen, wie z.B. Listerine (Johnsons & Johnson GmbH, Neuss, Deutschland), Meridol (CP Gaba GmbH, Hamburg, Deutschland) oder EZP entspricht. Die Konzentration der Tanninsäurelösung orientiert sich an ähnlichen Studien [109,112]. Für die Konzentration der Hopfenlösung gab es keine vorangegangenen Studien, an denen man sich orientieren konnte. Deshalb wurde die Firma Flavex, Rehlingen-Siersburg, Deutschland, damit beauftragt eine Lösung mit 1% Hopfenextrakt herzustellen. Diese Lösung war in Geschmack und Geruch annehmbar, weshalb keine weitere Verdünnung stattgefunden hat. Zum Vergleich: Die Konzentration an Hopfenextrakten in Bier liegt bei 0,0015-0,01% [48].

Insgesamt nahmen 3 Probanden an der Studie teil. Dies deckt sich mit der Probandenzahl ähnlicher *in-situ*-Studien [36,38]. Die geringe Probandenzahl hat verschiedene Gründe: Zum einen ist es schwierig, geeignete Probanden zu finden, die bereit sind bovine PK in ihrer Mundhöhle zu tragen, experimentelle Spüllösungen zu verwenden oder über einen Zeitraum von ca. 1,5 Jahren stetig mitzuwirken. Zum anderen ist die Versuchsdurchführung, die Herstellung der Dünnschnittpräparate und die Auswertung mittels TEM sehr zeitintensiv, weswegen das Mikroskopieren einer größeren Prüfkörperanzahl unverhältnismäßig aufwendig wäre. Nichtsdestotrotz reicht die Probandenzahl für eine Beschreibung der Demineralisationsprozesse und Pelikelmodifikation im Rahmen der Grundlagenforschung aus.

Zu Studienbeginn waren die Probanden 26 bis 30 Jahre alt und allesamt parodontal gesund und kariesfrei. Dieses Probandenkollektiv spiegelt nicht die durchschnittliche Bevölkerung wider. Vergleichende Proteom-Analysen von Trautmann *et al.* (2019), die die

Pellikelzusammensetzung von 24 Probanden untersuchten, zeigten dass sich die Pellikelproteome der Studienteilnehmer interindividuell stark unterschieden haben [93], weshalb man davon ausgehen kann, dass die Pellikelzusammensetzung der an dieser Studie teilnehmenden Probanden nicht so vielfältig ist, wie es bei einem größeren Probandenkollektiv, in dem auch kariesaktiven Probanden und Probanden anderer Altersgruppen partizipiert hätten, der Fall wäre. Folglich würde die Untersuchung einer größeren Probandenzahl zu einem genaueren Gesamtergebnis führen.

5.1.2 Prüfkörper

Als Substrat für die Pellikelbildung werden seit einigen Jahrzehnten vermehrt PK aus bovinen Zähnen verwendet. Sie sind ein geeignetes Substitut für die klinisch relevanteren PK aus humanen Zähnen, da sie eine bessere Verfügbarkeit bei guter Qualität aufweisen, eine größere Oberfläche und Dicke bieten und aus ethischer und infektiologischer Sicht unbedenklicher sind [111]. Für die vorliegende Studie sind insbesondere die dickeren Wurzelzahninschichten boviner Zähne unabdingbar gewesen, da die Prüfkörperrohlinge eine ausreichende Dentindicke für das Setzen einer Bruchkerbe und das Greifen mit den Nadelhaltern aufweisen mussten. Das Brechen der Prüfkörperrohlinge hatte den Vorteil, dass dadurch unbehandelte Bruchflächen als Substrat für die Pellikelbildung entstanden. Diese unbehandelten Bruchflächen sind im Vergleich zu den verwendeten Dentinoberflächen anderer Studien insofern erwähnenswert, da sie nicht poliert oder anderweitig bearbeitet wurden [78]. Ziel dieser Vorgehensweise war es, eine Veränderung der PK-Oberfläche während der Prüfkörperverarbeitung (z.B. Politur, Entfernung der Schmierschicht) zu vermeiden. Als Nachteile der Bruchpräparate können die unebenen Oberflächen, die geringe Prüfkörperdicke nach Brechen der Rohlinge und der nicht reproduzierbare Bruchprozess angesehen werden. Für einige Untersuchungsmethoden wie die Messung der Mineralfreisetzung (in Abhängigkeit der Oberfläche) oder Oberflächen-Mikrohärtemessung bedarf es jedoch glatter, einheitlicher und somit vergleichbarer Oberflächen. Diese Methoden sind an den Dentinbruchprüfkörpern nicht durchführbar.

Humanes und bovines Dentin haben einige Gemeinsamkeiten bezüglich chemischer Zusammensetzung und physikalischer Eigenschaften [111]. Trotzdem muss berücksichtigt werden, dass sie sich in manchen Aspekten, wie beispielsweise der Resistenz gegenüber Erosion unterscheiden [95,103]. Vergleichende Untersuchungen durch Lopes *et al.* (2009) haben gezeigt, dass sich humanes und bovines Dentin auch hinsichtlich des Tubulusdurchmessers und der Tubulusdichte unterscheiden. Dafür wurde Kronendentin in drei verschiedenen Tiefen untersucht.

Humanes Dentin hatte in sämtlichen Dentintiefen einen niedrigeren durchschnittlichen Tubulusdurchmesser (bei mittlerer Dentintiefe: 2,94 μm) als bovines Dentin (bei mittlerer Dentintiefe: 3,98 μm). Umgekehrt war die Tubulusdichte in humanem Dentin höher (bei mittlerer Dentintiefe: 22329/ mm^2) als in bovinem Dentin (bei mittlerer Dentintiefe: 15964/ mm^2) [63]. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse zur intratubulären Pellikelbildung und Pellikelbildung im Bereich der Tubuluseingänge sind zu hinterfragen, da es bei engeren humanen Dentintubuli vermutlich eher zu Verpfropfungen der Tubuluseingänge kommt als bei bovinem Dentin. Ferner ist die Rolle der organischen Dentinanteile und des Dentinliquors bei der Pellikelbildung bislang ungeklärt. Hier besteht noch Forschungsbedarf, um eine standardisierte Prüfkörperverarbeitung und Pellikelbildung für reproduzierbare Versuche herauszuarbeiten [78].

5.1.3 Pellikelbildung

Die *In-situ*-Pellikel wurde bukkal mit Hilfe von individuellen Trageschienen gewonnen. Dies ist eine gängige Methode, um die PK reproduzierbar an den gleichen Stellen innerhalb der Mundhöhle zu fixieren [77]. Nachteil dieser Methode ist die mögliche Beeinflussung der Pellikelbildung durch freigesetzte Silikonbestandteile, da Silikon zur Fixation der PK verwendet wird. Weiterhin kann es zu geringfügigen Veränderungen der Speichelzusammensetzung kommen da die Sulkusflüssigkeit durch Bedeckung der Sulki im Bereich der Schiene zurückgehalten wird. Die PK befinden sich nach Fixation auf den Trageschienen weiter bukkal als die eigentliche Bukkalfläche der Seitenzähne. Dies kann beispielsweise bei mastikatorischen Bewegungen zum verstärkten Kontakt zwischen dem PK und der Wangenschleimhaut führen, woraus stärkere, auf die Pellikel wirkenden Scherkräfte resultieren können [36]. Die *In-situ*-Pellikelbildung ist der *In-vitro*-Pellikelbildung vorzuziehen, da sie klinisch relevanter ist und nachweislich zu differenten Pellikelzusammensetzungen und -eigenschaften führt [29,76]. Untersuchungen von Hall *et al.* (1999) konnten zeigen, dass die *in-situ* gewonnene Pellikel säureprotektiver als die *in-vitro* gewonnene Pellikel ist [29]. Eine *in-vivo* gewonnene Pellikel würde die klinische Situation besser widerspiegeln, da humanes, nicht extrahiertes Substrat für die Pellikelbildung verwendet werden würde. Allerdings müsste der Zahn für anschließende Untersuchungen extrahiert werden, was aus ethischer Sicht nicht vertretbar ist.

Die Pellikel wurde wie in vielen vergangenen Studien nur bukkal gebildet [77]. Jedoch muss bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden, dass sich die Pellikelzusammensetzung und -morphologie je nach Bildungsort innerhalb der Mundhöhle unterscheidet [10,36]. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die palatinal gebildete Schmelzpellikel nach

verschiedenen Pellikelbildungszeiten dünner als die bukkal gebildete Pellikel ist [3,36], eine andere Proteinzusammensetzung besitzt [97], und dadurch ihre erosionsprotektiven Eigenschaften beeinflusst werden [3]. Um die erosionsprotektiven Eigenschaften der Kurzzeit- und Langzeitdentinpellikel zu evaluieren, wurden in dieser Studie sowohl Untersuchungen an einer 3min-Pellikel als auch an einer 2h-Pellikel durchgeführt. Diese Pellikelbildungszeiten eignen sich gut, da man nach 3 min davon ausgehen kann, dass bereits Proteinagglomerate an die PK-Oberfläche adhärirt sind. Zwei Stunden sind eine geeignete und häufig verwendete Bildungszeit zur Untersuchung maturierter Pellikel, da diese dann meist mit einer kontinuierlichen Dicke von bis zu 1000 nm verläuft, die Proteinadsorption und -desorption ausgeglichen ist und längere Bildungszeiten eher zur Entstehung eines bakteriellen Biofilms führen [6,36,62]. Letztlich konnten die Ergebnisse für beide Reifegrade verglichen werden und somit auch der bislang kontrovers diskutierte Hypothese, ob eine reifere Pellikel säureprotektiver ist, nachgegangen werden.

Die in dieser Studie gewonnenen Pellikel waren von direkten Einflüssen durch Nahrungsmittel und Mundhygieneprodukte verschont, da vor und während der Pellikelbildung auf Nahrungsmittelkonsum und MundhygieneprozEDUREN verzichtet wurde.

5.1.4 TEM-Analyse

Während der Herstellung der 50-70 nm dicken Dünnschnitte kam es durch den Schneideprozess mit dem Ultramikrotom, aufgrund der tubulären Dentinstruktur und hohen Anteils organischen Materials, stellenweise zu Stauchungen und Streckungen der Präparate. Insbesondere die Stauchung und dadurch Überlappung des Präparates führte zur Unkenntlichmachung einiger Dentinbereiche (Abb. 54). Die Elektronendichte der Präparate war innerhalb einer Versuchsgruppe häufig nicht einheitlich, was möglicherweise durch die leicht variierende Dünnschnittdicke hervorgerufen wurde. Folglich ist die Beurteilung der Veränderung der Elektronendichte durch Mundspülungen kritisch zu hinterfragen, da die höhere Elektronendichte auch aus einem dickeren Dünnschnitt resultieren kann. Die Analyse mittels TEM ist eine qualitative Messmethode für Demineralisationen. Vor allem bei schwachen Demineralisationen eignen sich eher quantitative Messmethoden, wie beispielsweise die Bestimmung der Calciumfreisetzung nach Säureangriff [83]. Ferner sind die nanometerdicken Dünnschnitte nur sehr kleine Ausschnitte der Millimeter großen PK. Deshalb wurden repräsentative Areale der PK ausgewählt und zahlreiche Bilder aufgenommen. Trotzdem sollte diese Gegebenheit stets bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

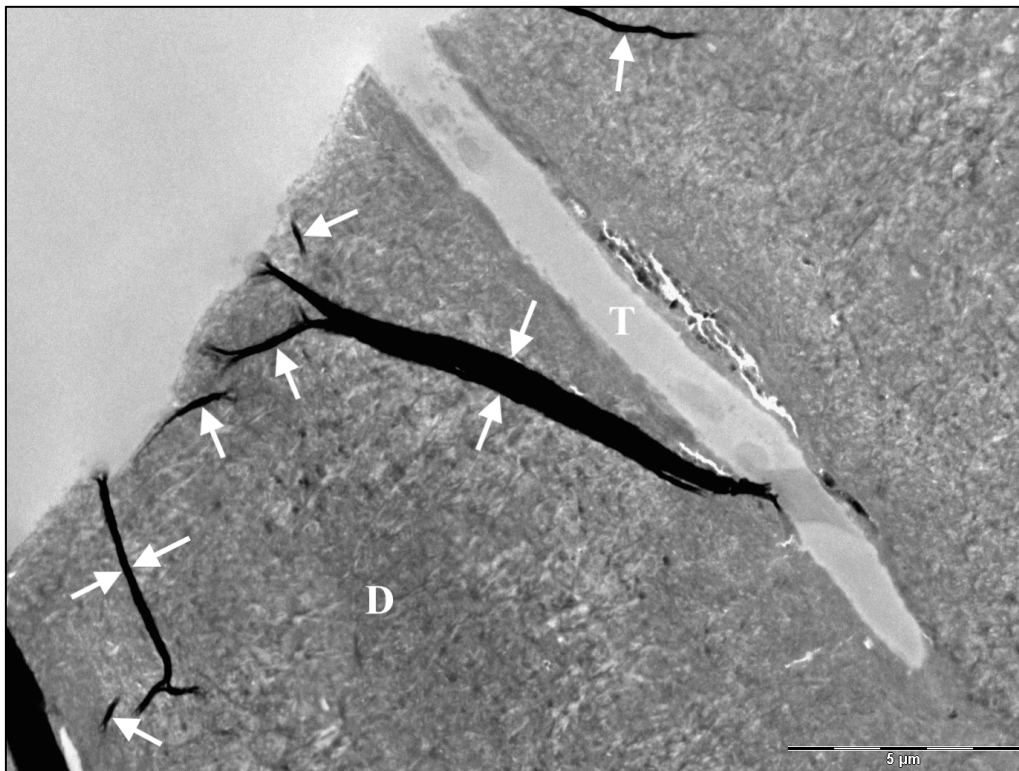


Abb. 54: Dentin-Dünnschnittpräparat (D) mit Dentintubulus (T) in der Übersichtsaufnahme: Beim Schneiden des Prüfkörpers mit dem Ultramikrotom kommt es zu Stauchungen am Dünnschnittpräparat. Dadurch entstehen Überlappungen (Pfeile), die ein Durchstrahlen der Elektronen aufgrund einer höheren Präparatdicke verhindern. Vergrößerung: 4.800-fach; Längenskalen = 5000 nm

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Diskussion der Pellikelultrastruktur

Versuche mit Wasser

Die 3min-Pellikel der Kontrollgruppe war bis zu 340 nm, im Durchschnitt jedoch ca. 100 nm breit. Sie verlief nicht kontinuierlich, vielmehr waren einzelne Proteinagglomerate an der Dentinoberfläche erkennbar. Eine durchgehend verlaufende elektronendichte Basisschicht ist nicht erkennbar gewesen. Es lag keine bakterielle Adhärenz vor. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von Bauer (2011), die ebenfalls Dentinpellikel mit unterschiedlichen Bildungszeiten untersuchte, überein [6]. Die Kontinuität der Dentinpellikel unterschied sich im Vergleich zur Schmelzpellikel, die sich bereits nach wenigen Minuten morphologisch als kontinuierliche 10-20 nm breite Schicht darstellt [40].

Die 2h-Dentinpellikel der Kontrollgruppe verlief kontinuierlich auf der gesamten PK-Oberfläche. Die durchschnittliche Dicke von ca. 500 nm war leicht höher als die

durchschnittliche gemessene Dicke (400 nm) bei Bauer (2011), wobei auch diese Messwerte nur punktuell ermittelt wurden [6]. Morphologisch stellte sich die 2h-Pellikel zusammengesetzt aus der dünnen elektronendichten Basisschicht und der äußeren, dickeren granulär-globulär strukturierten Schicht, wie vielfach in der Literatur beschrieben, dar [40]. Auch das Vorkommen vereinzelter Bakterien deckt sich mit Ergebnissen älterer Studien [40].

Bakterien waren häufig im Bereich von Tubuluseingängen und innerhalb der Tubuli nachweisbar. Dies deckt sich mit früheren Untersuchungen, die eine bakterielle Penetration bis zu einer Tiefe von 15 µm mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop, Rasterelektronenmikroskop und TEM nachweisen konnten. Jung *et al.* (2010) maßen eine intratubuläre Pellikeldicke von 10-20 nm, die jedoch nicht mit der durchschnittlichen intratubulären Pellikeldicke, die in der vorliegenden Studie gemessen wurde, übereinstimmt. Diese hatte nach 2 h eine Dicke von 100-200 nm (Abb. 8 und Abb. 51). Dies kann durch die interindividuelle Pellikelbildung verschiedener Probanden bedingt sein [93]. Auch die vorliegende Studie zeigt, dass eine gewisse Varianz zwischen den Pellikeldicken der Probanden herrscht. Zudem zeigen zu verschiedenen Tageszeiten gebildete Pellikel differente Eigenschaften und folgen demnach einem gewissen zirkadianen Rhythmus [72].

Die Pellikel auf bovinem Dentin könnte sich hinsichtlich der Morphologie von der auf humanem Dentin gewonnenen Pellikel unterscheiden. Möglicherweise kommt es bei humanem Dentin häufiger zu Verpfropfungen im Bereich der Tubuluseingänge, bedingt durch den kleineren Tubulusdurchmesser (siehe 5.1.2). Leider gibt es bislang keine Studie, die eine auf humanen Prüfkörpern gebildete intratubuläre Dentinpellikel detailliert beschreibt.

Versuche mit Tanninsäurelösung

Da bis *dato* keine Analyse zur Veränderung der Morphologie der Dentinpellikel nach Tanninsäurebehandlung vorliegt, werden die Ergebnisse mit ähnlichen Versuchen an der Schmelzpellikel diskutiert. Eine Vermehrung der globulären Partikel wie bei Untersuchungen von Yazdani (2021) konnte nicht beobachtet werden [112]. Jedoch stellte sich in der vorliegenden Studie nach Spülung mit Tanninsäurelösung tendenziell eine elektronendichtere und leicht verdickte Pellikel dar, wie bereits für die Schmelzpellikel beschrieben [79,112].

Versuche mit Hopfenlösung

Die untersuchten 3min-Dentinpellikel nach Spülung mit Hopfenlösung unterschieden sich morphologisch nicht von der Kontrolle. Die Pellikeldicken waren ebenfalls ähnlich.

Die 2h-Dentinpellikel nach Spülung mit Hopfenlösung war tendenziell etwas dicker als die Kontrolle und ebenfalls leicht elektronendichter. Dies liegt am hohen Polyphenolanteil der Hopfenlösung und deckt sich mit den TEM-Ergebnissen zur Modifikation der Schmelzpellikel mit Hopfenlösung [112]. Vereinzelt Bakterien konnten in dieser Versuchsgruppe nachgewiesen werden, wobei das Auftreten ähnlich häufig war wie in der Kontrollgruppe. Dies deckt sich nicht mit den Studienergebnissen von Shinada *et al.* (2007), die eine Verringerung der Bakterienanzahl nach Spülung mit Hopfenextrakten nachweisen konnten [85]. Dies liegt möglicherweise an den unterschiedlichen Versuchsaufbauten, da in der erwähnten Studie fünf Mal am Tag über einen Zeitraum von drei Tagen mit Hopfenlösung gespült wurde [85]. Das mehrmalige und wiederholte Spülen könnte die antibakteriellen Effekte ausmachen.

Versuche mit Elmex Zahnschmelz Professional

Die Dentinpellikel stellte sich nach Spülung mit EZP morphologisch ähnlich zur Kontrollpellikel dar. Eine Präzipitation zinnhaltiger, globulärer Strukturen auf der PK-Oberfläche, wie in Studien, die Schmelz als Substrat verwendeten [4,17], konnte mittels TEM-Analyse nicht nachgewiesen werden. Eine weiterführende, durch unser Labor durchgeführte Elementanalyse mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie konnte ebenfalls keine nennenswerten Zinn-Anteile in der Pellikel nachweisen. Verantwortlich für das Fehlen der Zinn-Präzipitate auf der PK-Oberfläche könnte die Pellikel sein, da die oben erwähnten Studien ohne Pellikelbildung und *in-vitro* durchgeführt wurden. Weiterhin findet bei *in-vitro*-Versuchen keine Verdünnung der getesteten Spüllösung durch Speichel wie im Falle der hier durchgeführten Studie statt, weshalb das Spülagens unter *in-vitro*-Bedingungen in einer höheren Konzentration an der PK-Oberfläche agiert. Die dadurch an der PK-Oberfläche höher verfügbare Zinn-Konzentration kann möglicherweise die Bildung der Präzipitate fördern.

5.2.2 Diskussion der Demineralisationszonen

Die Literaturrecherche brachte insgesamt Uneinigkeit zum Thema Erosionsprotektivität der Dentinpellikel hervor [78]. Die bislang durchgeführten Studien hatten uneinheitliche Studiendesigns und sind daher schwer zu vergleichen. Beispielsweise fand in der Studie von Cheung *et al.* (2005) ein klinisch unverhältnismäßig langer Säureangriff [11], oder in der Studie von Hall *et al.* (1999) eine zu lange Pellikelbildungszeit von 14 Tagen, statt [29]. Dahingegen konnten erosionsprotektive Eigenschaften der Schmelzpellikel bereits in vielen Studien nachgewiesen werden [41]. Auch Verbesserungen dieser Eigenschaften durch Modifikation mit Polyphenolen konnten für die Schmelzpellikel mehrfach belegt werden [47,102].

Folgendermaßen lassen sich die Demineralisationsvorgänge beschreiben: Semipermeable Eigenschaften von Biofilm und Pellikel ermöglichen Säuren die Diffusion und das Erreichen der bedeckten Dentinoberfläche, wodurch der Erosionsprozess eingeleitet wird. Anschließend ist eine Penetration der Säuren in die organische Matrix des Dentins und die Diffusion durch Protein- und Lipidbeschichtungen der Hydroxylapatit-Kristallite notwendig. Am Wirkort, nämlich der Kristallitoberfläche, kommt es zur Dissoziation der Säure unter Abgabe von Wasserstoffionen (H^+), die sowohl an die Phosphatgruppe des Hydroxylapatits als auch an Carbonat, das den häufigsten Substituenten des Phosphats im Hydroxylapatit-Gefüge darstellt, binden können. Dies führt zur Freisetzung sämtlicher Kristallit-Moleküle und folglich zu dessen Auflösung [19]. Im Falle der in dieser Studie verwendeten Zitronensäure sind auch die Carboxylgruppen mit ihren chelatisierenden Eigenschaften am Erosionsprozess beteiligt. Nach Abgabe ihrer Wasserstoffionen liegen sie im deprotonierten Zustand (COO^-) vor, können Calcium des Hydroxylapatits binden und zusätzlich zum Zerfall des Kristallgefüges beitragen [19].

Mehrere Studien konnten zeigen, dass das Ausmaß der Erosion von mehreren Faktoren wie z.B. dem pH-Wert der Säure oder der Einwirkzeit abhängig ist [118]. Berücksichtigt man, dass Dentin sowohl aus anorganischer als auch organischer Substanz besteht, sind zwei getrennt ablaufende Prozesse an der Dentinerstörung beteiligt. Zum einen wird Hydroxylapatit, der anorganische Anteil des Dentins (ca. 70 Gew.%), durch Säuren chemisch aufgelöst (s.o.) [28], zum anderen kommt es durch Erniedrigung des pH-Wertes im Dentin zu einer Aktivierung von MMPs, die wiederum zum Abbau des organischen Anteils (ca. 20 Gew.%) des Dentins, zum Großteil Kollagen Typ I, führen [28,91]. Die Aktivierung dieser Proteasen beginnt bei einem pH-Wert $< 4,5$ und setzt später als die Demineralisation, meist in Folge starker Säureangriffe, ein [91]. Der in dieser Studie durchgeführte Säureangriff führte zwar zur Demaskierung des Kollagennetzwerks, da Hydroxylapatit-Kristallite bereits aufgelöst wurden, jedoch nicht zu seiner Degradation. Das Kollagennetzwerk ist zum Großteil intakt geblieben (vgl. Abb. 16 und Abb. 38). Im Erosionsprozess stellt das Kollagennetzwerk eine Diffusionsbarriere für Säuren dar und vermindert dadurch Demineralisationen in der Tiefe des Dentins [69]. In vergleichenden Untersuchungen zeigten antierosive Substanzen wie Fluorid und Zinn eine bessere protektive Wirkung, wenn die organischen Dentinbestandteile vor Säureangriff nicht entfernt wurden. Ihr Vorhandensein wird eine wichtige Rolle in der Wirkung oben genannter antierosiver Substanzen zugesprochen [25].

Die Demineralisation an der Dentinoberfläche geschieht nicht im gleichen Umfang wie an der Tubulusoberfläche. Dies liegt daran, dass die Dentinoberfläche aus schwächer mineralisiertem

intertubulärem Dentin besteht, im Gegensatz zum stärker mineralisierten peritubulären Dentin (elektronendichte Schicht der Tubuluswände, vgl. Abb. 6), welches die Tubuli auskleidet. Der höhere Anteil an anorganischem Material macht das peritubuläre Dentin vulnerabler gegenüber Säureangriffen. Daher kommt es bei Erosionen von Dentin zuerst zur Demineralisation der Tubuluswände [70]. Bei Versuchen mit EZP konnten kaum Erosionen des intertubulären Dentins dargestellt werden. Trotzdem waren die Tubuluswände stets demineralisiert. Hieraus lässt sich möglicherweise ein Marker für leichte Demineralisationserscheinungen ableiten.

Die Demineralisation von Dentin wurde hauptsächlich im Rahmen der Kariesforschung beschrieben. Hier ist zu erwähnen, dass es dabei um Demineralisation des Dentins durch bakteriell gebildete Säuren handelt und sich klinisch von einer reinen erosionsbedingten Demineralisation, die bislang jedoch unzureichend untersucht worden ist, unterscheiden könnte. Ähnlich zu Schmelzläsionen, konnten bei Dentinläsionen ebenfalls Demineralisationen unterhalb einer pseudointakten Oberfläche beschrieben werden [92]. Solche ‚subsurface lesions‘ konnten auch bei den Präparaten des Versuchs IV, also nach Spülung mit dem fluorid- und zinnhaltigen Präparat Elmex Zahnschmelz Professional beobachtet werden (vgl. Abb. 48). Für das Auftreten solcher Läsionen könnte vor allem der Fluoridanteil verantwortlich sein, der zur Ausbildung einer protektiven Calciumfluorid-Schicht auf der Dentinoberfläche führt [69]. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass diese weniger beständig ist, als die Calciumfluorid-Schicht die sich auf Schmelzoberflächen ausbilden kann [23]. Auch die Substitution von Hydroxylapatit durch Fluorapatit, das ein niedrigeres Löslichkeitsprodukt besitzt, ist ein möglicher Mechanismus der beteiligt sein kann [14]. Veränderungen der Größe der Hydroxylapatit-Kristallite im Bereich der oberflächlichen Dentinschicht wurden von Tohda et al. (1996) beschrieben. Zwar konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl längliche Kristallite als auch kürzere, leicht runde Kristallite (vgl. Abb. 37) in allen Versuchsgruppen beobachtet werden, jedoch waren nach Spülung mit EZP keine besonders langen Kristallite nach Fluoridbehandlung zu beobachten. Innerhalb der Erosionszonen waren hauptsächlich längliche Kristallite zu beobachten. Dies könnte damit zusammenhängen, dass kleine Kristallite eine größere Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis aufweisen als große Kristallite und dadurch leichter anätzbar sind [19].

Die verschiedenen Demineralisationsmuster und die randomisierte Verteilung der nadelförmigen Hydroxylapatit-Kristallite werden in dieser Studie erstmalig beschrieben. Bei Betrachtung der TEM-Aufnahmen von Bauer (2011) konnten diese Muster zum Teil ebenfalls identifiziert werden und können durch folgende Prinzipien erklärt werden: Für die Ansammlung im äußeren Bereich der Demineralisationszone könnten elektrochemische Kräfte zwischen den Kristalliten

und der proteinreichen Pellikel verantwortlich sein. Im Falle einer vorherigen Spülung mit EZP ist möglicherweise die Ausbildung einer Calciumfluoridschicht oder der Einbau von Fluorapatit in das Kollagenetzwerk denkbar. Im inneren Bereich der Demineralisationszone werden die Kristallite möglicherweise sichtbar, da sich dort nur eine schwache Demineralisation der anorganischen Anteile abspielt, die zu einer unvollständigen Auflösung der Hydroxylapatit-Kristallite führt. Der Übergang von Hydroxylapatit-Kristalliten in die Pellikel kann durch den gitterartigen Aufbau der Pellikel und ihre semipermeablen Eigenschaften erklärt werden [40]. Die für diese Kristallit-Verteilung verantwortlichen Prozesse sollten in zukünftigen Studien näher untersucht werden. Ebenso ist die Remineralisation des Dentins und insbesondere der ‚subsurface lesions‘ ein wichtiger Ansatzpunkt zur Prävention und Behandlung von Dentinerosionen.

Versuche mit sterilem Wasser

Die Ergebnisse der Kontrollgruppe bestätigen die Hypothese, dass eine maturierte Pellikel säureprotektiver ist, da die durchschnittlichen Demineralisationstiefen bei Versuchen mit der 2h-Pellikel geringer waren als bei der 3min-Pellikel. Dies lässt sich vor allem durch die dickere Diffusionsbarriere, die die Säuren stärker abhalten kann, erklären [40]. Einen erosionsprotektiven Effekt der 30min-Pellikel konnte Bauer (2011) mittels TEM nicht nachweisen [6]. Daraus lässt sich ableiten, dass die Säureprotektivität der Pellikel im Zeitraum zwischen 30 min und 2 h zunehmen muss. In diesem Zeitraum nimmt die Pellikel an Dicke zu, weshalb die dickere Diffusionsbarriere für diese Effekte verantwortlichen sein könnte [40]. Weiterhin könnten auch strukturelle Veränderungen sowie Veränderungen der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Proteine in der maturierten Dentinpellikel die höhere Erosionsprotektivität bewirken [30].

Versuche mit Tanninsäurelösung

Die Tanninsäurelösung hatte nach Herstellung einen sauren pH-Wert und hat bereits bei alleiniger Anwendung ohne Säureangriff leichte Erosionen verursacht. Die Erosionstiefen nach Spülung mit Tanninsäurelösung waren trotz ähnlicher pH-Werte der Agenzien (Tanninsäurelösung 1%ig: pH 2,9; Zitronensäurelösung 1%ig: pH 2,2) jedoch nicht so hoch, wie nach Säureangriff mit der Zitronensäurelösung. Dies ist zum einen durch die Verdünnung und Pufferung der Tanninsäurelösung durch Speichel zu erklären [86]. Zum anderen wird auch die beobachtete höhere elektronendichte, und Dickenzunahme der Pellikel den Erosionsprozess beeinflussen. Ferner kommt es zu Reaktionen zwischen den Polyphenolen und Proteinen der Pellikel, die zu einer erhöhten Säureresistenz führen [7,20]. Möglicherweise sind zu Beginn der Mundspülung mit Tanninsäurelösung noch wenig Polyphenol-Protein-Komplexe gebildet, weswegen eine

leichte Demineralisation stattfindet. Des Weiteren ist anzunehmen, dass die Pellikel auch nach bestmöglicher Modifikation keinen vollständigen Schutz vor Erosionen bieten wird.

Die Demineralisationszone war durchschnittlich geringfügig schmaler als bei der Kontrollgruppe. Dieser, durch Spülung mit Tanninsäurelösung ausgelöste säureprotektive Effekt, bestätigt die in der Literatur beschriebene Wirkung von Polyphenolen auf die Pellikel. Ein adstringierender Effekt auf Speichel und Pellikel ist mehrfach belegt. Die Modifikation der *in-vitro* gewonnenen Pellikel durch Schwarztee- und Rotwein-Polyphenole führte auch zu einer verstärkten Proteinadsorption und erhöhten Resistenz gegenüber verschiedener Pufferlösungen [53]. Eine verringerte Desorption der Pellikelproteine nach Polyphenol-Modifikation konnte ebenfalls nachgewiesen werden und ist auf eine durch Polyphenole induzierte Quervernetzung von Pellikelproteinen zurückzuführen [20,53]. Die genannten Prozesse sind Hinweise auf die erosionsprotektiven Mechanismen der Polyphenole. Andererseits untersuchte Lotter (2018) die Oberflächen-Mikrohärte von Dentinprüfkörpern nach Modifikation mit Tanninsäurelösung und Säureangriff, konnte dabei jedoch keine höheren Mikrohärte-Werte und somit erosionsprotektiven Effekte, im Vergleich zur Kontrolle, nachweisen [64].

Versuche mit Hopfenlösung

Die Pellikel erscheint auch hier etwas elektronendichter im Vergleich zur Pellikel der Kontrollgruppe, jedoch ist sie weniger elektronendicht als die mit Tanninsäurelösung behandelte Pellikel. Tendenziell führte die Modifikation der Dentinpellikel mit der Hopfenlösung zu einer Erhöhung der Erosionsprotektivität, da die durchschnittliche Erosionstiefe etwas geringer ausfiel als bei der Kontrollgruppe. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Yazdani (2020), die selbiges für die Modifikation der Schmelzpellikel mit Hopfenlösung nachweisen konnte [112]. Auch hier ist mutmaßlich die Bildung von Polyphenol-Protein-Komplexen für die höhere Elektronendichte und die schwachen erosionsprotektiven Effekte verantwortlich.

Versuche mit Elmex Zahnschmelz Professional

Nach Spülung mit EZP und anschließendem Säureangriff zeigt sich eine schmale Demineralisation der Tubuluswände, jedoch kaum Demineralisation im Bereich der eigentlichen PK-Oberfläche. Eine primäre Demineralisation der Tubuluswände wurde auch durch Meurman und ten Cate (1996) beschrieben [70]. Die Tubuluswände bestehen aus peritubulärem Dentin, welches im Gegensatz zum intertubulären Dentin stärker mineralisiert ist und eine kompaktere Struktur aufweist. Dadurch geschieht die Entkalkung der Tubuluswände schneller und kann somit als frühes Anzeichen einer Demineralisation angesehen werden [26]. Da die gemessenen

Erosionstiefen nach Spülung mit EZP stets viel niedriger waren als beim Kontrollversuch, konnten die in der Literatur beschriebenen erosionsprotektiven Eigenschaften von EZP eindeutig verifiziert werden. Nichtsdestotrotz konnten mittels TEM keine morphologischen Veränderungen der Pellikel nachgewiesen werden. Die EZP-modifizierte Pellikel war der unmodifizierten Pellikel der Kontrollversuche ähnlich und im Vergleich zur Tanninsäure-modifizierten Pellikel schmaler und weniger elektronendicht.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in vergangenen Studien konnten keine nennenswerten Zinn-Anteile bei weiteren Nachuntersuchungen der Präparate auf ihr elementare Zusammensetzung nachgewiesen werden. In Studien ohne vorangegangene Pellikelbildung bildete sich auf Schmelz-PK eine dünne zinnhaltige Schicht nach Zinnapplikation [4,17]. Auf Dentin führten Zinnapplikationen zur Bildung zinnhaltiger Präzipitate [26]. In letztgenannter Studie konnte gezeigt werden, dass sich Zinnkomplexe nach Demineralisation sowohl in die freiliegende organische Matrix einlagern können, aber auch vollständig durch diese Matrix diffundieren und sich im darunterliegenden mineralisierten Dentin anreichern [26]. Die Erkenntnisse der Literatur konnten in dieser Studie somit nicht abgebildet werden. Einzig die Pellikel könnte für die negativen Ergebnisse als Erklärung dienen, da oben genannte Studien keine vorausgehende Pellikelbildung auf den PK aufwiesen. Die Pellikel fungiert möglicherweise als Barriere für die Zinnionen und verhindert dadurch ihre Diffusion und Präzipitation [40]. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf, da die Mechanismen die für die erosionsprotektiven Effekte des Zinns verantwortlich sind bislang unzureichend untersucht wurden.

5.3 Schlussfolgerungen

Die kommerziell erhältliche Mundspüllösung Elmex Zahnschmelz Professional ist ein potentielles Präparat für die Prävention von Erosionen am Dentin. Dahingegen zeigten die Tanninsäure- und Hopfenlösung nur schwache erosionsprotektive Effekte. Der Säureangriff führte bei allen untersuchten Präparaten zur Demineralisation des Dentins. Die Demineralisationszone stellte sich als schwach elektronendichter Bereich, der aus dem Kollagennetzwerk und gelösten Hydroxylapatit-Kristalliten besteht, dar. Die Verteilung der Kristallite war randomisiert, mit Ballungen im Bereich der inneren und äußeren Grenzen der Demineralisationszone, weshalb die Demineralisationszonen kein einheitliches Muster aufwiesen. Die dafür verantwortlichen Prozesse gilt es in Zukunft weiter zu erforschen, um daraus einen möglichen Nutzen für die Erosionsprävention und -therapie zu ziehen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abbas DK, Skjørland KK, Gjermo P, Sønju T (1985) Chemical and morphological studies of the acquired pellicle formed subgingivally on dentin in vivo. *Acta Odontol Scand* 43:31–37
2. Algarni AA, Lippert F, Hara AT (2015) Efficacy of stannous, fluoride and their combination in dentin erosion prevention in vitro. *Braz Oral Res* 29:S1806-83242015000100270
3. 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
4. Babcock FD, King JC, Jordan TH (1978) The reaction of stannous fluoride and hydroxyapatite. *J Dent Res* 57:933–938
5. Bartlett DW (2005) The role of erosion in tooth wear: aetiology, prevention and management. *Int Dent J* 55:277–284
6. Bauer C (2011) Ultrastrukturelle Analyse von Bioadhäsions- und Erosionsprozessen am Dentin. Med. Diss. Homburg/Saar. URL: <https://publikationen.sulb.uni-saarland.de/bitstream/20.500.11880/21609/1/Dissertation.pdf>
7. Bennick A (2002) Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med* 13:184–196
8. Bhattacharya S, Virani S, Zavro M, Haas GJ (2003) Inhibition of *Streptococcus mutans* and Other Oral streptococci by hop (*Humulus lupulus* L.) constituents. *Econ Bot* 57:118–125
9. Brex M, Brownstone E, MacDonald L, Gelskey S, Cheang M (1992) Efficacy of Listerine, Meridol and chlorhexidine mouthrinses as supplements to regular tooth cleaning measures. *J Clin Periodontol* 19:202–207
10. Carlén A, Börjesson AC, Nikdel K, Olsson J (1998) Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. *Caries Res* 32:447–455
11. Cheung A, Zid Z, Hunt D, McIntyre J (2005) The potential for dental plaque to protect against erosion using an in vivo-in vitro model--a pilot study. *Aust Dent J* 50:228–234

12. Curzon MEJ, Preston AJ (2004) Risk groups: nursing bottle caries/caries in the elderly. *Caries Res* 38:24–33
13. Cvikl B, Lussi A, Carvalho TS, Moritz A, Gruber R (2018) Stannous chloride and stannous fluoride are inhibitors of matrix metalloproteinases. *J Dent* 78:51–58
14. Czajka-Jakubowska AE, Liu J, Chang S-R, Clarkson BH (2009) The effect of the surface characteristics of various substrates on fluorapatite crystal growth, alignment, and spatial orientation. *Med Sci Monit* 15:MT84-88
15. De Menezes Oliveira MAH, Torres CP, Gomes-Silva JM, Chinelatti MA, De Menezes FCH, Palma-Dibb RG, Borsatto MC (2010) Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth. *Microsc Res Tech* 73:572–577
16. Delecrode TR, Siqueira WL, Zaidan FC, Bellini MR, Leite AL, Xiao Y, Rios D, Magalhães AC, Buzalaf MAR (2015) Exposure to acids changes the proteomic of acquired dentine pellicle. *J Dent* 43:583–588
17. Ellingsen JE (1986) Scanning electron microscope and electron microprobe study of reactions of stannous fluoride and stannous chloride with dental enamel. *Scand J Dent Res* 94:299–305
18. Ericsson Y (1950) Reduction of the solubility of enamel surfaces. *Acta Odontol Scand* 9:60–83
19. Featherstone JDB, Lussi A (2006) Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci* 20:66–76
20. Flemming J, Meyer-Probst CT, Speer K, Kölling-Speer I, Hannig C, Hannig M (2021) Preventive applications of polyphenols in dentistry-A review. *Int J Mol Sci* 22:4892
21. Frazier RA, Deaville ER, Green RJ, Stringano E, Willoughby I, Plant J, Mueller-Harvey I (2010) Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *J Pharm Biomed Anal* 51:490–495
22. Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Lavery D, Dietrich T (2017) Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. *J Clin Periodontol* 44 Suppl 18:S94–S105
23. Ganss C, Schlueter N, Klimek J (2007) Retention of KOH-soluble fluoride on enamel and dentine under erosive conditions--A comparison of in vitro and in situ results. *Arch Oral*

Biol 52:9–14

24. Ganss C, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Schlueter N (2010) Efficacy of a tin/fluoride rinse: a randomized in situ trial on erosion. *J Dent Res* 89:1214–1218
25. Ganss C, Lussi A, Sommer N, Klimek J, Schlueter N (2010) Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. *Caries Res* 44:248–252
26. Ganss C, Hardt M, Lussi A, Cocks A-K, Klimek J, Schlueter N (2010) Mechanism of action of tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in dentine - an in vitro tin-uptake, tissue loss, and scanning electron microscopy study. *Eur J Oral Sci* 118:376–384
27. Glantz P-O (1969) On wettability and adhesiveness: a study of enamel, dentine, some restorative dental materials, and dental plaque. *Odontol Revy* 20:5–124
28. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A (2011) Dentin: Structure, Composition and Mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)* 3:711–735
29. Hall AF, Buchanan CA, Millett DT, Creanor SL, Strang R, Foye RH (1999) The effect of saliva on enamel and dentine erosion. *J Dent* 27:333–339
30. Hannig C, Hannig M, Attin T (2005) Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci* 113:2–13
31. Hannig C, Wasser M, Becker K, Hannig M, Huber K, Attin T (2006) Influence of different restorative materials on lysozyme and amylase activity of the salivary pellicle in situ. *J Biomed Mater Res A* 78:755–761
32. Hannig C, Becker K, Häusler N, Hoth-Hannig W, Attin T, Hannig M (2007) Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion - an ex vivo pilot study. *Arch Oral Biol* 52:444–449
33. 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
34. Hannig C, Wagenschwanz C, Pötschke S, Kümmerer 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
35. 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

36. Hannig M (1999) Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig* 3:88–95
37. Hannig M, Balz M (1999) Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 33:372–379
38. 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
39. Hannig M, Fiebiger M, Güntzer M, Döbert A, Zimehl R, Nekrashevych Y (2004) Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Arch Oral Biol* 49:903–910
40. Hannig M, Joiner A (2006) The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci* 19:29–64
41. Hannig M, Hannig C (2014) The pellicle and erosion. *Monogr Oral Sci* 25:206–214
42. Hara AT, Ando M, González-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT (2006) Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. *J Dent Res* 85:612–616
43. Hariyani N, Setyowati D, Spencer AJ, Luzzi L, Do LG (2018) Root caries incidence and increment in the population - A systematic review, meta-analysis and meta-regression of longitudinal studies. *J Dent* 77:1–7
44. Hay DI (1973) The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 18:1517–1529
45. Hayes M, Burke F, Allen PF (2017) Incidence, Prevalence and Global Distribution of Root Caries. *Monogr Oral Sci* 26:1–8
46. Hertel S, Graffy L, Pötschke S, Basche S, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C (2016) Effect of *Inula viscosa* on the pellicle's protective properties and initial bioadhesion in-situ. *Arch Oral Biol* 71:87–96
47. Hertel S, Pötschke 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
48. Heyerick A, Zhao Y, Sandra P, Huvaere K, Roelens F, De Keukeleire D (2003) Photolysis of hop-derived trans-iso-alpha-acids and trans-tetrahydroiso-alpha-acids: product identification in relation to the lightstruck flavour of beer. *Photochem Photobiol Sci* 2:306–314

49. Houghton JW, Yong JT, Carpenter G, Bartlett D, Moazzez R, O'Toole S (2020) Differences in the Natural Enamel Surface and Acquired Enamel Pellicle following Exposure to Citric or Hydrochloric Acid. *Caries Res* 54:226–233
50. Hove LH, Holme B, Young A, Tveit AB (2008) The protective effect of TiF₄, SnF₂ and NaF against erosion-like lesions in situ. *Caries Res* 42:68–72
51. Imfeld T (1996) Dental erosion. Definition, classification and links. *Eur J Oral Sci* 104:151–155
52. Ionta FQ, Alencar CRB de, Santos NMD, Bergantin BTP, Val PP, Honório HM, Oliveira TM de, Rios D (2018) Effect of palm oil alone or associated to stannous solution on enamel erosive-abrasive wear: A randomized in situ/ex vivo study. *Arch Oral Biol* 95:68–73
53. 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
54. 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
55. Jung DJ, Al-Ahmad A, Follo M, Spitzmüller 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
56. Kaczmarek B (2020) Tannic Acid with Antiviral and Antibacterial Activity as A Promising Component of Biomaterials-A Minireview. *Materials* 13:E3224
57. Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MAR (2009) Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *J Appl Oral Sci* 17:560–564
58. Kensche A, Buschbeck E, König B, Koch M, Kirsch J, Hannig C, Hannig M (2019) Effect of fluoride mouthrinses and stannous ions on the erosion protective properties of the in situ pellicle. *Sci Rep* 9:5336
59. Kim TJ, Silva JL, Kim MK, Jung YS (2010) Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. *Food Chem* 118:740–746
60. Kohavi D, Klinger A, Steinberg D, Mann E, Sela NM (1997) alpha-Amylase and salivary albumin adsorption onto titanium, enamel and dentin: an in vivo study. *Biomaterials* 18:903–906

61. Kosoric J, Williams RAD, Hector MP, Anderson P (2007) A Synthetic Peptide Based on a Natural Salivary Protein Reduces Demineralisation in Model Systems for Dental Caries and Erosion. *Int J Pept Res Ther* 13:497–503
62. Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG (2000) Saliva and dental pellicle--a review. *Adv Dent Res* 14:22–28
63. Lopes MB, Sinhoreti MAC, Gonini Júnior A, Consani S, McCabe JF (2009) Comparative study of tubular diameter and quantity for human and bovine dentin at different depths. *Braz Dent J* 20:279–283
64. Lotter KM (2018) Die erosionsprotektive Wirkung von Tanninsäure und ätherischen Ölen auf bovines Dentin im In-situ-Versuch. Med. Diss. Homburg/Saar. URL: <https://publikationen.sulb.uni-saarland.de/handle/20.500.11880/27419>
65. Lussi A, Jaeggi T, Zero D (2004) The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res* 38 Suppl 1:34–44
66. Lussi A, Jaeggi T (2008) Erosion--diagnosis and risk factors. *Clin Oral Investig* 12 Suppl 1:S5-13
67. Lussi A, Megert B, Shellis RP, Wang X (2012) Analysis of the erosive effect of different dietary substances and medications. *Br J Nutr* 107:252–262
68. Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MAR (2009) Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *J Dent* 37:994–998
69. Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Buzalaf MAR, Lussi A (2011) Fluoride in dental erosion. *Monogr Oral Sci* 22:158–170
70. Meurman JH, ten Cate JM (1996) Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci* 104:199–206
71. Milligan SR, Kalita JC, Heyerick A, Rong H, De Cooman L, De Keukeleire D (1999) Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2249–2252
72. Morge S, Adamczak E, Lindén LA (1989) Variation in human salivary pellicle formation on biomaterials during the day. *Arch Oral Biol* 34:669–674
73. Nieuw Amerongen AV, Oderkerk CH, Driessen AA (1987) Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Res*

21:297–309

74. Nobbs AH, Jenkinson HF, Jakubovics NS (2011) Stick to your gums: mechanisms of oral microbial adherence. *J Dent Res* 90:1271–1278
75. Nordbo H (1977) Discoloration of dental pellicle by tannic acid. *Acta Odontol Scand* 35:305–310
76. Pelá VT, Cassiano LPS, Ventura TM da S, Souza-E-Silva CM de, Gironda CC, Rios D, Buzalaf MAR (2018) Proteomic analysis of the acquired enamel pellicle formed on human and bovine tooth: a study using the Bauru in situ pellicle model (BISPM). *J Appl Oral Sci* 27:e20180113
77. Prada-López I, Quintas V, Vilaboa C, Suárez-Quintanilla D, Tomás I (2016) Devices for In situ Development of Non-disturbed Oral Biofilm. A Systematic Review. *Front Microbiol* 7:1055
78. Rasputnis W, Schestakow A, Hannig M (2021) The dentin pellicle - A neglected topic in dental research. *Arch Oral Biol* 129:105212
79. 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
80. Salas MMS, Nascimento GG, Huysmans MC, Demarco FF (2015) Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: an epidemiological systematic review and meta-regression analysis. *J Dent* 43:42–50
81. Sarni-Manchado P, Cheynier V, Moutounet M (1999) Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *J Agric Food Chem* 47:42–47
82. Schiffner U (2021) Verwendung von Fluoriden zur Kariesprävention. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 64:830–837
83. Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C (2011) Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Res* 45 Suppl 1:13–23
84. Schwendicke F, Nitschke I, Stark H, Micheelis W, Jordan RA (2020) Epidemiological trends, predictive factors, and projection of tooth loss in Germany 1997-2030: part II. Edentulism in seniors. *Clin Oral Investig* 24:3997–4003
85. 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

86. 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
87. Slomiany BL, Murty VL, Zdebska E, Slomiany A, Gwozdziński K, Mandel ID (1986) Tooth surface-pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic-acid diffusion in man. *Arch Oral Biol* 31:187–191
88. Sönju T, Christensen TB, Kornstad L, Rølla G (1974) Electron microscopy, carbohydrate analyses and biological activities of the proteins adsorbed in two hours to tooth surfaces in vivo. *Caries Res* 8:113–122
89. Tagashira M, Uchiyama K, Yoshimura T, Shiota 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
90. 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
91. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T (1998) The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 77:1622–1629
92. Tohda H, Fejerskov O, Yanagisawa T (1996) Transmission Electron Microscopy of Cementum Crystals Correlated with Ca and F Distribution in Normal and Carious Human Root Surfaces. *J Dent Res* 75:949–954
93. Trautmann S, Barghash A, Fecher-Trost C, Schalkowsky P, Hannig C, Kirsch J, Rupf S, Keller A, Helms V, Hannig M (2019) Proteomic Analysis of the Initial Oral Pellicle in Caries-Active and Caries-Free Individuals. *Proteomics Clin Appl* 13:e1800143
94. Trautmann S, Künzel N, Fecher-Trost C, Barghash A, Schalkowsky P, Dudek J, Delius J, Helms V, Hannig M (2020) Deep Proteomic Insights into the Individual Short-Term Pellicle Formation on Enamel-An In Situ Pilot Study. *Proteomics Clin Appl* 14:e1900090
95. Turssi CP, Messias DF, Corona SM, Serra MC (2010) Viability of using enamel and dentin from bovine origin as a substitute for human counterparts in an intraoral erosion model. *Braz Dent J* 21:332–336

96. Van Huysen G, Muhler JC (1948) Enamel solubility reducing effect of flavored low concentration stannous fluoride solution. *J Dent Res* 27:46–51
97. Ventura TM da S, Cassiano L de PS, Souza E Silva CM de, Taira EA, Leite A de L, Rios D, Buzalaf MAR (2017) The proteomic profile of the acquired enamel pellicle according to its location in the dental arches. *Arch Oral Biol* 79:20–29
98. Vogel GL (2011) Oral fluoride reservoirs and the prevention of dental caries. *Monogr Oral Sci* 22:146–157
99. Vukosavljevic D, Custodio W, Buzalaf MAR, Hara AT, Siqueira WL (2014) Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Arch Oral Biol* 59:631–638
100. Walsh T, Worthington HV, Glenny A-M, Marinho VC, Jeronic A (2019) Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. *Cochrane Database Syst Rev* 3:CD007868
101. Watts A, Addy M (2001) Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *Br Dent J* 190:309–316
102. Weber M-T, Hannig M, Pötschke S, Höhne 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
103. 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
104. West NX, Hughes JA, Addy M (2000) Erosion of dentine and enamel in vitro by dietary acids: the effect of temperature, acid character, concentration and exposure time. *J Oral Rehabil* 27:875–880
105. Wetton S, Hughes J, West N, Addy M (2006) Exposure time of enamel and dentine to saliva for protection against erosion: a study in vitro. *Caries Res* 40:213–217
106. Wiegand A, Stock A, Attin R, Werner C, Attin T (2007) Impact of the acid flow rate on dentin erosion. *J Dent* 35:21–27
107. Wiegand A, Gutsche M, Attin T (2007) Effect of olive oil and an olive-oil-containing fluoridated mouthrinse on enamel and dentin erosion in vitro. *Acta Odontol Scand* 65:357–361
108. Wiegand A, Rosemann A, Hoch M, Barke S, Dakna M, Kanzow P (2019) Erosion-Protective Capacity of the Salivary Pellicle of Female and Male Subjects Is Not Different. *Caries Res* 53:636–642

109. Xi Q, Hoth-Hannig W, Deng S, Jin X, Fu B, Hannig M (2020) The effect of polyphenol-containing solutions on in situ biofilm formation on enamel and dentin. *J Dent* 102:103482
110. Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RF, Oppenheim FG (2003) Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *J Biol Chem* 278:5300–5308
111. Yassen GH, Platt JA, Hara AT (2011) Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci* 53:273–282
112. Yazdani Badabi N (2020) Modifizierung des initialen Biofilms durch natürliche Extrakte in-situ. Med. Diss. Homburg/Saar. URL: <https://publikationen.sulb.uni-saarland.de/handle/20.500.11880/31330>
113. Yu H, Oho T, Xu LX (1995) Effects of several tea components on acid resistance of human tooth enamel. *J Dent* 23:101–105
114. Yu H, Attin T, Wiegand A, Buchalla W (2010) Effects of various fluoride solutions on enamel erosion in vitro. *Caries Res* 44:390–401
115. Yu H, Wegehaupt FJ, Zaruba M, Becker K, Roos M, Attin T, Wiegand A (2010) Erosion-inhibiting potential of a stannous chloride-containing fluoride solution under acid flow conditions in vitro. *Arch Oral Biol* 55:702–705
116. Zanolli P, Rivasi M, Zavatti M, Brusiani F, Baraldi M (2005) New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol* 102:102–106
117. Zanolli P, Zavatti M (2008) Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol* 116:383–396
118. Zero DT, Lussi A (2005) Erosion--chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J* 55:285–290
119. Zhang YF, Zheng J, Zheng L, Shi XY, Qian LM, Zhou ZR (2013) Effect of adsorption time on the lubricating properties of the salivary pellicle on human tooth enamel. *Wear* 301:300–307

7 Publikation / Danksagung

7.1 Publikation

Auszüge aus der vorliegenden Promotionsarbeit wurden im Artikel „The dentin pellicle - A neglected topic in dental research“ (2021) in der Fachzeitschrift „Archives of Oral Biology“ publiziert [78].

7.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich zunächst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Matthias Hannig für das Überlassen des Themas, die gute Betreuung und die Anregungen zu Verbesserungen danken.

Besonders danken möchte ich auch Belinda König und Norbert Pütz für die Unterweisung sowie Unterstützung bei der Transmissionselektronenmikroskopie. Dr. Simone Trautmann danke ich für die Mitwirkung bei der Studienplanung und Bashar Reda für die Hilfe bei der Prüfkörperherstellung.

Ich danke meinen Eltern und meinem Bruder für den Zuspruch, die bedingungslose Unterstützung und die Ermöglichung des Studiums. Von ganzem Herzen danke ich meiner Freundin Natalia Martynova für den stetigen Rückhalt, den Zuspruch und die unermüdliche moralische Unterstützung.

Ebenfalls möchte ich mich für die Finanzierung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 1027) bedanken.

8 Lebenslauf

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

9 Anhang

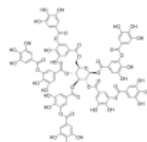
Datenblatt Zitronensäure-Monohydrat

ANALYSENZERTIFIKAT CERTIFICATE OF ANALYSIS		SERVA ■ serving scientists ■	
Zitronensäure p. A. Citric acid analytical grade		Kat.Nr./Cat.No. :	38640
		Lot/Contr.No. :	160448
Parameter parameter	Methode method	Spezifikation specification	Ergebnis result
Summenformel formula		C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O	
Molekulargewicht molecular weight		210.14	
Aussehen appearance		weiße Kristalle white crystals	entspricht corresponds
Gehalt (%) assay	Titration	99.5 – 101.0	100.1
Wasser (%) water	KF	7.5 – 9.0	8.5
Sulfatasche (%) sulfated ash		max. 0.1	< 0.05
Identität identity	IR	entspricht corresponds	entspricht corresponds
Mindesthaltbarkeit minimum shelf life			30.06.2021
Lagerung (°C) storage			+15 bis/ to +30
<p>Die Eignung des Produktes für spezielle Anwendungszwecke wird nicht zugesichert. Dieses Dokument entbindet nicht von einer branchenüblichen Eingangskontrolle. We do not guarantee that the product can be used for a special application. This document does not release you from performing the standard control upon receipt of incoming goods.</p>			
SERVA Electrophoresis GmbH Qualitätskontrolle/ Quality Control		Druckdatum/ printing date: 22.05.2019	
Christian Monsler		Patricia Milford	
<p>Dieses Dokument ist ein Computerausdruck und deshalb ohne Unterschrift gültig. This report has been computer generated and does not contain a signature.</p>			
<p>SERVA Electrophoresis GmbH • D-69115 Heidelberg • Carl-Benz-Straße 7 Tel.: +49 6221 13840-0 • Fax: +49 6221 13840-10 • E-Mail: info@serva.de • https://www.serva.de</p>			

Datenblatt Tanninsäure-Pulver

SIGMA-ALDRICH®*sigma-aldrich.com*

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA









Website: www.sigmaaldrich.comEmail USA: techserv@sial.comOutside USA: eurtechserv@sial.com**Product Specification**Product Name:
Tannic acidProduct Number: **W304204**
CAS Number: 1401-55-4Formula: C₇₆H₅₂O₄₆
Formula Weight: 1,701.2 g/mol**TEST****Specification**

Appearance (Color)	Light Beige to Dark Beige to Dark Brown
Appearance (Form)	Powder
Infrared spectrum	Conforms to Structure
Carbon	45.5 - 61.6 %
Water (by Karl Fischer)	≤ 10.0 %
Arsenic (As)	≤ 3 ppm
Cadmium (Cd)	≤ 1 ppm
Mercury (Hg)	≤ 1 ppm
Lead (Pb)	≤ 10 ppm
Expiration Date Period	-----
60 Months	

Specification: PRD.3.ZQ5.10000076725

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Datenblatt Hopfen CO2-to Extrakt

Version Nr. 081.002_08_S, Datum: 27.05.2020		 <p>Hochdruckextraktion mit CO₂</p> <p>since 1986 FLAVEX[®] Naturextrakte</p>
<h2>Allgemeine Spezifikation</h2> <h3>Hopfen CO2-to Extrakt</h3> <h4>Typ Nr. 081.002</h4>		
Rohstoff:	Humulus lupulus - Blüten = Hopfenzapfen, getrocknet	  
Herstellung:	Hergestellt durch Hochdruckextraktion mit natürlicher Quellkohensäure, daher keine Lösungsmittelrückstände und keine Rückstände von anorganischen Salzen und Schwermetallen, keine vermehrungsfähigen Keime [1].	
D/E - Verhältnis:	3,5 - 4,0 kg Hopfenzapfen ergeben 1 kg Produkt.	
Sensorische Beschreibung:	Grün-brauner, bei Raumtemperatur pastöser Extrakt.	
Zusammensetzung:	100 % Hopfen CO2-to Extrakt	
Inhaltsstoffe:	Summe der Humulone (alpha Säuren): 38 - 58 %: zusammengesetzt aus: 28 - 43 % n- + Adhumulon und 10 - 15 % Cohumulon, Summe der Lupulone (beta Säuren): 16 - 30 %: zusammengesetzt aus: 9 - 16 % n- + Adlupulon und 7 - 14 % Colupulon.	
Kennzeichnung:	Für Lebensmittel: Aromaextrakt oder Hopfenextrakt Für Nahrungsergänzungsmittel: Hopfenextrakt Für Kosmetik: INCI-Name: Humulus Lupulus Extract, CAS-Nr. 8060-28-4, EINECS-Nr. 232-504-3	
Verwendung:	Traditionelle Anwendung: Hopfenextrakte werden in pflanzlichen Arzneimitteln gegen Befindungsstörungen, wie Unruhe, Angstzustände und Schlafstörungen eingesetzt. Zudem wird Hopfen in der Volksmedizin äußerlich zur Behandlung von Hautverletzungen und innerlich bei Blasenentzündungen verwendet [2]. Für Lebensmittel: Hopfenextrakte werden vor allem in der Bierindustrie zur Aromatisierung und Konservierung eingesetzt. Aufgrund seines charakteristischen Aromas kann der Extrakt aber auch in Getränken, Süßwaren, Backwaren oder Milchprodukten verwendet werden. Für Nahrungsergänzungsmittel: Aufgrund seiner physiologischer Wirkung und traditionellen Anwendung eignet sich der Hopfenextrakt auch zur Verwendung in Nahrungsergänzungsmitteln [3].	
<hr/> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <p>FLAVEX Naturextrakte GmbH Nordstr. 7, D-66780 Rehlingen</p> </div> <div> <p>Fon +49 (0)6835 91950 Fax +49 (0)6835 919595</p> </div> <div> <p>E-Mail: info@flavex.com http://www.flavex.com</p> </div> </div>		
   		Seite 1 von 2. 



Version Nr. 081.002_08_S, Datum: 27.05.2020

Für Kosmetik:

Der Extrakt kann in Parfums mit aromatisch, krautigen Noten verwendet werden. Hopfen verleiht zudem dunklem Haar einen schönen Glanz und ist daher auch gut für den Einsatz in Haarpflegeprodukten geeignet [4]. Aufgrund der guten Wirksamkeit gegen grampositive Bakterien eignet sich der Hopfenextrakt auch gut als Zusatzstoff für desodorierende Seifen, Duschgels, Deo-Sticks und Aerosol-Sprays, da grampositiven Bakterien für unangenehme Körpergerüche verantwortlich sind [5].

Handhabung:

Vor Gebrauch mischen!

Die konzentrierten FLAVEX-Extrakte sind Grundstoffe für die Produktformulierung. Sie sind daher im Lebensmittelbereich nicht zum direkten Verzehr, im Kosmetik-, Parfüm- und Aromatherapiebereich nicht zur direkten Anwendung auf die Haut gedacht. Von Kindern fernhalten!

Haltbarkeit:

Unangebrochene Gebinde sind ohne Qualitätsverlust, unter Ausschluss von Licht und bei folgender Lagerung, mindestens 5 Jahre haltbar:
Kühl, trocken und unter Schutzgas lagern!

Transport:

Kein Gefahrgut im Sinne der Transportvorschriften.

REACH - Status:

Der Stoff wurde registriert unter folgender Nummer: 01-2120766018-52-xxxx

Zertifizierung:

- HALAL zertifiziert durch HCS (Halal Certification Services)
- KOSCHER zertifiziert durch KLBD (Beth Din Kashrut Division)

Konformität:

Das Produkt entspricht den Anforderungen der VO (EG) Nr. 1334/2008 über Aromen und den Anforderungen der VO (EG) Nr. 1223/2009 über kosmetische Mittel in der derzeit gültigen Fassung.

Literatur:

- [1] P. Manninen, E. Häivälä, S. Sarimo, H. Kallio, Distribution of microbes in supercritical CO₂ extraction of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides) oils, Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung / Springer-Verlag (1997) 204: 202-205
- [2] F. C. Czygan, D. Frohne, Chr. Hölzfel, A. Nagell, P. Pachaöy, H. J. Pfänder, M. Wichtl, g. Willuhn, W. Buff, Teedrogen und Phytopharmaka, 3. Auflage., Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH 1997
- [3] Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), European Medicines Agency (EMA), Assessment report on Humulus lupulus L., flos, (2014) EMA/HMPC/418902/2005
- [4] Wolfgang Blascheck u.a. (Hrsg.), HagerROM 2017, Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2017
- [5] Langezaal CR et al., Antimicrobial Screening of essential oils and extracts of some Humulus lupulus L.cultivars, Pharmaceutisch Weekblad. Scientific Ed. 14, 353, 1992

Haftungsausschluss:

Diese Spezifikation wurde nach bestem Wissen und Gewissen zur Kundeninformation erstellt, aber unter Ausschluss jeglicher Gewährleistung, insbes. bezüglich der Verletzung von Eigentumsrechten dritter Seite durch die Verwendung des Produkts. Die Aussagen zur Verwendung basieren auf Literaturangaben und haben informellen Charakter. Die Aussagen wurden nicht von den zuständigen Behörden bewertet und sie beziehen sich nicht auf Fertigprodukte. Der Vermarkter eines Fertigproduktes, das einen FLAVEX Extrakt als Bestandteil enthält, ist verantwortlich dafür, dass die Produktaussagen rechtmäßig sind und die geltenden Gesetze und Vorschriften des Landes, in dem das Produkt verkauft wird, eingehalten werden.

FLAVEX Naturextrakte GmbH
Nordstr. 7, D-66780 Rehlingen

Fon +49 (0)6835 91950
Fax +49 (0)6835 919595

E-Mail: info@flavex.com
<http://www.flavex.com>

Seite 2 von 2.

