

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

Der Effekt von Polyphenolen auf die „subsurface“ Pellikel

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2021

vorgelegt von:

Johanna Katharina Otterbach

geb. am: 30.06.1988 in Kirchen (Sieg)

Tag der Promotion: 13.07.2021
Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger
1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hannig
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. K. Freier

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
1.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache	1
1.2 Abstract	2
2. Einleitung	3
2.1 Einführung in das Thema	3
2.2 Die Pellikel	3
2.2.1 Bildung, Aufbau, Struktur	3
2.2.2 Funktion	8
2.2.3 Subsurface Pellikel	12
2.3 Polyphenole	13
2.3.1 Tannine	14
2.3.2 Experimentelles Hopfenextrakt	18
2.4 Ätiologie der Erosion	19
2.5 Fragestellung	21
3. Material und Methode	22
3.1 Studiendesign	22
3.2 Gewinnung der Pellikel in-situ	22
3.2.1 Herstellung der Prüfkörper	22
3.2.2 Herstellung der Schienen	23
3.2.3 Montieren der Prüfkörper auf den Schienen	23
3.2.4 Intraorale Exposition der Schienen	24
3.3 Vorbereitung der Prüfkörper für die Untersuchung mittels Mikroskops	24
3.3.1 Rasterelektronenmikroskop	24
3.3.2 Transmissionselektronenmikroskop	25
3.4 Phosphorsäure	26
3.5 Vorversuche	27
3.5.1 Bestimmung der Einwirkdauer der Phosphorsäure	27
3.5.2 Bewertung der Pellikelschicht	27
3.5.3 Bestimmung der Art und Einwirkzeit der Polyphenole	27
3.5.4 Festlegung der erneuten Einwirkdauer der Phosphorsäure	28

3.6	Hauptversuche.....	29
4.	Ergebnisse	30
4.1	Ergebnisse der Vorversuche	30
4.1.1	Ergebnisse der Vorversuche zur Pellikelschicht.....	32
4.1.2	Ergebnisse der Vorversuche zur Art und Einwirkzeit der Polyphenole	35
4.1.3	Ergebnisse der Vorversuche zur erneuten Einwirkdauer der Phosphorsäure	45
4.2	Ergebnisse der Hauptversuche.....	48
5.	Diskussion	64
5.1	Diskussion von Material und Methoden.....	64
5.2	Diskussion der Ergebnisse	69
5.2.1	Diskussion der Vorversuche	69
5.2.2	Diskussion der Hauptversuche.....	72
6.	Literaturverzeichnis	75
7.	Danksagung	85
8.	Lebenslauf	86

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache

Innerhalb von wenigen Sekunden nach der Reinigung der Zahnoberfläche bildet sich auf dieser ein Belag aus Speichelbestandteilen, die dentale Pellikel. Es konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden, dass die Pellikel in der Lage ist, die Zahnhartsubstanz zu schützen. Dies gilt im Speziellen bezogen auf die Erosion durch Bestandteile unserer Nahrung, aber auch auf Abrasion und Attrition. Auch konnte bereits nachgewiesen werden, dass die protektive Wirkung der Pellikel durch die Behandlung mit Polyphenolen erheblich erhöht werden kann. Dies wurde bisher jedoch nur bei intakter Zahnschmelzoberfläche analysiert.

Ziel dieser Studie ist es zu zeigen, dass sich die protektive Wirkung auch bei der sogenannten subsurface Pellikel, welche sich auf vorgeschädigtem, erodiertem Zahnschmelz bildet, durch die Behandlung mit Polyphenolen verbessern lässt. Bei den Polyphenolen, welche in dieser Studie verwendet wurden, handelt es sich um Tanninsäure, Epigallocatechingallat und um ein experimentelles Hopfenextrakt.

Bei der Versuchsdurchführung wurden bovine Schmelz-Prüfkörper zunächst 10 s mit Phosphorsäure angeätzt, um die Erosion der Zahnhartsubstanz zu imitieren. Anschließend wurden die Prüfkörper auf individuell gefertigte Zahnschienen montiert und zur Pellikelgewinnung 2 h im Oberkiefer getragen. Ein Teil der Proben wurde nun, entsprechend des Versuchsprotokolls, *in-vitro* mit den oben genannten Polyphenolen behandelt, bevor alle Proben erneut 10 s mit Phosphorsäure geätzt wurden. Hierdurch ergaben sich eine Kontrollgruppe, welche nicht mit Polyphenolen in Berührung kam, und eine Vergleichsgruppe. Mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskops wurde die Pellikel nun im Hinblick auf ihre Dicke und Elektronendichte hin untersucht.

Es konnte beobachtet werden, dass die subsurface Pellikel nach der Behandlung mit Polyphenolen deutlich dicker und elektronendichter war als die auf den Prüfkörpern der Kontrollgruppe. Auch nach der erneuten Säureätzung war dies noch zu beobachten.

Das Ergebnis dieser Studie ist also, dass sich auch auf bereits erodiertem Zahnschmelz eine deutlich verbesserte Schutzfunktion der mit Polyphenolen modifizierten subsurface Pellikel, verglichen mit der unbehandelten Pellikel, erzielen lässt.

Die Kenntnis über die Möglichkeiten der Pellikelmodifikation mittels Polyphenolen und die damit verbundenen Änderungen von deren Struktur und Funktion können zukünftig zur Entwicklung neuer therapeutischer Maßnahmen beitragen. Diese könnten dazu dienen, erosive

Schäden der Zahnhartsubstanz zu minimieren und somit die Prävalenz für Folgeerkrankungen wie Karies und Parodontitis zu reduzieren. Hierfür sind zunächst aber noch weitere Studien nötig, die das protektive Verhalten der modifizierten Pellicel weiter erforschen, eventuell auch in Bezug auf erodiertes Dentin.

1.2 Abstract

When exposed to the oral environment, the enamel surface is covered by a film of adsorbed salivary proteins, the acquired dental pellicle. This process takes seconds. Several publications have already shown that the salivary film might protect the enamel surface. In particular, this has been shown in the case of erosion, for abrasion and attrition. The protective abilities of the pellicle can be increased when modified with polyphenols. Until now this has only been shown on intact tooth surface.

The aim of this study is to analyze the protective property of the so called “subsurface” pellicle. This pellicle forms on enamel when the surface has already been damaged due to erosive challenges and if its protection ability might be increased when treated with polyphenols. The polyphenols that have been used in this study are tannic acid, epigallocatechingallate and an experimental hop extract.

Bovine enamel specimens have been used for the experiments. They were treated with phosphoric acid resulting in erosive damage. Subsequently the specimens were assembled on splints, which were worn intraorally for 2 h on the upper jaw in order to generate the pellicle. According to the protocol, some specimens were then treated *in-vitro* with the above named polyphenols. After that all of the specimen were exposed to phosphoric acid for 10 s. The non-polyphenol group act as a control group. Using transmission electron microscopy, the pellicle was analyzed with regard to its electron density and thickness.

It could be shown, that electron density and thickness of the pellicle increased after treatment with polyphenols when compared with the control group. After etching, the modified pellicle showed a higher electron density and thickness.

The present study demonstrated that on damaged enamel, the subsurface pellicle might be modified by polyphenols resulting in an increased protection property compared to the untreated pellicle.

This study warrants further investigations: it needs to be evaluated, if and how polyphenols, when added to the daily oral hygienic products or food might be used to reduce erosive damage of the teeth and thereby reduce the prevalence of caries.

2. Einleitung

2.1 Einführung in das Thema

In einigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der Zahnschmelz durch den zunehmenden Konsum von Säuren in unserer Nahrung immer mehr geschädigt wird (Slomiany et al. 1986; Jarvinen et al. 1991; Hannig C. et al. 2009). Die mineralischen Bestandteile wie Calcium und Phosphat werden unter anderem durch den Konsum von Softdrinks und Zitrusfrüchten regelrecht aus ihm herausgelöst, und der Zahn wird zunehmend empfindlicher gegen den Angriff von Bakterien und damit für die Entstehung von Karies (Jarvinen et al. 1991; Hannig C. et al. 2005a).

Zum Schutz gegen diesen Angriff von Säuren bildet sich unmittelbar nach der Reinigung der Zähne auf deren Oberfläche eine dünne Schicht aus Speichelbestandteilen, die dentale Pellikel (Hannig M. & Balz 1999; Hannig M. 1999).

Jüngste Studien zeigen, dass diese Pellikel, durch den Einsatz von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten und durch reine Polyphenole, derart modifiziert werden konnte, dass sie einen stabileren Schutz gegenüber Säuren gewährleistet (Weber et al. 2015; Hertel et al. 2017). Bisher wurde diese Eigenschaft jedoch nur auf unversehrter, intakter Zahnoberfläche nachgewiesen. In der Realität sieht es jedoch so aus, dass die Zahnhartsubstanz meist schon teilweise demineralisiert und nicht mehr gänzlich unversehrt ist.

Ziel dieser Studie ist es zu zeigen, dass sich die Schutzfunktion der Pellikel gegenüber einem Säureangriff, nach der Behandlung mit Polyphenolen, auch auf bereits erodierter Zahnhartsubstanz verbessern lässt.

2.2 Die Pellikel

2.2.1 Bildung, Aufbau, Struktur

Alexander Nasmyth war 1839 der Erste, der die Pellikel beschrieb. Er ging davon aus, dass es sich dabei um eine, die Zahnoberfläche bedeckende Membran embryologischen Ursprungs handelte (Nasmyth 1839; Lendenmann et al. 2000). Erst Jahre später entdeckte man, dass die embryologische Membran kurz nach dem Durchbruch des Zahnes abgestreift wird, um durch eine erworbene, zell- und bakterienfreie Schicht aus Speichelbestandteilen ersetzt zu werden, die „acquired pellicle“ (Dawes et al. 1963).

Die Pellikel ist eine semipermeable Membran, welche alle Zahnoberflächen und restaurativen Materialien mit Kontakt zur Mundhöhle bedeckt (Hannig M. 1997; Hannig M. et al. 2003). Sie bildet sich in einem selektiven Adsorptionsprozess aus Makromolekülen, die aus dem Speichel, der Sulkusflüssigkeit, dem Blut, der Mundschleimhaut und aus der Nahrung stammen (Hannig M. 1999; Hannig M. & Hannig C. 2014). Auch Bestandteile von Bakterienzellwänden sowie Teile lysierter Bakterien sind nachweisbar (Armstrong 1968).

Ihre Bildung erfolgt in zwei Phasen: Die erste Phase ist durch den schnellen Aufbau einer basalen, kompakten Pellikelschicht gekennzeichnet, während die zweite langsame Phase dem weiteren Pellikelwachstum dient (Hannig M. 1999). Die initiale basale Schicht ist homogen strukturiert, fein granuliert und elektronendicht mit einer Dicke von 10-20 nm, welche die gesamte Zahnoberfläche innerhalb von Sekunden nach der Zahnreinigung bedeckt (Hannig M. 1999). Bei den Speichelproteinen, die in dieser Phase eine wichtige Rolle spielen, handelt es sich insbesondere um Histatin 1, Statherin und PRPs (Prolin-Rich-Proteins) (Hay 1973; Jensen et al. 1992). Sie zeichnen sich durch eine hohe Affinität zu Hydroxylapatit aus und initiieren den Prozess der Pellikelbildung, indem sie durch elektrostatische Wechselwirkungen an den Schmelz binden (Hay 1973). Dementsprechend werden sie auch als Pellikel-Präkursoren bezeichnet (Hay 1973). Im weiteren Verlauf kann man nach dieser schnellen initialen Phase eine langsamere Phase beobachten, in der sich nach weiteren Minuten und Stunden eine heterogene Schicht aus Speichelbestandteilen mit lockerem Kontakt zur basalen Schicht bildet (Hannig M. 1999). Diese Phase hat ein globuläres Erscheinungsbild und ist von stetiger Proteinadsorption geprägt, welche zu einer Zunahme der Pellikeldicke bis 1300 nm und wieder zunehmender Homogenität nach 24 h führt (Hannig M. 1999). Je nach Lokalisation in der Mundhöhle unterscheidet sich die Pellikel hinsichtlich ihrer Dicke, der Elektronendichte, der Struktur und der Aufbaudauer (Hannig M. 1999). Dies ist das Ergebnis einer Studie von M. Hannig, in welcher er die Pellikel von bukkal und lingual getragenen Prüfkörpern mittels Transmissionselektronenmikroskopie hinsichtlich ihrer Dicke und Struktur miteinander verglich. Die sich zeigenden Unterschiede führte er auf die unterschiedliche Speichelzusammensetzung und den Speichelfluss der verschiedenen Speicheldrüsen und auf intraoral wirkende Scherkräfte zurück (Hannig M. 1999).

Wichtige Moleküle in der Pellikel sind Proteine, die aus dem Speichel adsorbiert werden (Al-Hashimi & Levine 1989). Bereits seit einigen Jahrzehnten ist die Identifizierung der Proteine von Speichel und Pellikel ein wichtiger Bestandteil der Forschung und Gegenstand vieler Publikationen (Hay 1973; Al-Hashimi & Levine 1989; Hannig M. 1999; Lendenmann et al.

2000; Siqueira et al. 2012b). Während man heute besonderes Augenmerk auf das Proteom legt, wurde noch bis Anfang der 2000er Jahre das Aminosäureprofil identifiziert. So untersuchten Skjørland et al. 1995 die Pellikel von drei Probanden mit dem Ergebnis, dass 60% der Aminosäuren zu den neutralen und sauren gehörten, und alleine 25% durch die beiden am häufigsten vorkommenden Aminosäuren Glutaminsäure und Glycin repräsentiert wurden. Dabei variierte die Aminosäurezusammensetzung stark mit dem Alter der Pellikel (Skjørland et al. 1995). Lendenmann et al. verglichen im Jahre 2000 die Aminosäurezusammensetzung in der Pellikel mit der im Speichel und stellten signifikante Unterschiede in deren Zusammensetzung fest. Bei der Adsorption der Aminosäuren handelt es sich dementsprechend um einen selektiven Prozess (Lendenmann et al. 2000).

Bei der Identifizierung der Proteine fand man heraus, dass die bedeutsamsten Proteine in der Pellikel unter anderem sekretorisches IgA, Lysozym, Statherin, PRPs, Albumin und Amylase sind (Al-Hashimi & Levine 1989; Siqueira et al. 2012b). Daneben konnten aber auch Muzin MG1, IgM, IgG, Cystatin SA-1, Lactoferrin und Komplementfaktoren C3/C3c nachgewiesen werden (Al-Hashimi & Levine 1989). Als Vertreter der bakteriellen Proteine wurde Glycosyltransferase aus Streptokokken (GTF) beobachtet (Lendenmann et al. 2000). Insgesamt konnten 190 Proteine in einer 3 min Pellikel identifiziert werden, von denen 72 hauptsächlich zur initialen Pellikelschicht zu zählen sind (Deliuss et al. 2017). Die schnelle und stetige Adsorption der Proteine an die Zahnoberfläche ist von großer Bedeutung bei der Bildung der Pellikel (Zhang et al. 2015). Die hierbei wirkenden Kräfte sind vor allem hydrophobe sowie elektrostatische Wechselwirkungen (Svendsen et al. 2006). Mit zunehmender Adsorptionszeit steigt die Kraft, mit der die basale Pellikelschicht am Schmelz haftet, exponentiell auf bis zu 900 nN nach 60 min an (Zhang et al. 2015). Sie ist damit mehr als doppelt so groß wie die Kraft, die zwischen basaler Pellikelschicht und der zweiten lockeren Schicht besteht, welche sich auf 400 nN beläuft (Zhang et al. 2015).

In der initialen Phase wirken vor allem starke elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Schmelzoberfläche und Speichelproteinen, während die zweite Phase der Pellikelbildung von eher schwachen Van-der-Waals-Kräften und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen initialer Schicht und weiteren Speichelproteinen geprägt ist (Zhang et al. 2015). Lee et al. fanden heraus, dass sich die Proteine der Pellikel, entsprechend der Rolle, die sie bei der Pellikelformation spielen, in drei Gruppen kategorisieren lassen. Die erste Gruppe, zu der unter anderem PRPs und Histatine gehören, besteht aus Proteinen, welche Calcium binden können. Die Proteine der zweiten Gruppe binden bevorzugt Phosphationen und die der dritten Gruppe können Interaktionen mit anderen Proteinen eingehen (Lee et al. 2013). Siqueira et al. untersuchten

2012 das Proteom der Pellikel und des Speichels. Sie stellten, ergänzend zu der Studie von Lee et al. fest, dass Proteine wie Defensin 1 und Lysozym, welche Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eingehen, mit fortschreitender Zeit eine Zunahme im gesamten Pellikelproteom zeigten. Dahingegen nahm der Gehalt der Proteine, welche eine Affinität zu Hydroxylapatit zeigen, wie z.B. Cystatin S und α -Amylase, mit zunehmender Zeit ab (Siqueira et al. 2012b). Durch diese Daten konnte das Zwei-Schichten-Modell des Pellikelaufbaus erneut bestätigt werden (Hannig M. & Hannig C. 2014)

Bei den Proteinen spielen vor allem die Enzyme eine wichtige Rolle (Hannig C. et al. 2005b). Sie beeinflussen die Pellikel im Hinblick auf deren Funktion, Formation und Modulation auf den Zähnen (Hannig C. et al. 2005b). Während Peroxidase und Lysozym wichtige schützende, antibakterielle Aufgaben besitzen, unterstützen Amylasen die Enzyme und den Metabolismus der Bakterien, und die Glycosyltransferasen erleichtern deren Kolonisation in der Pellikel (Hannig C. et al. 2005b). Auch Carboanhydrasen, die wichtig für die pH Homöostase sind, alkalische Phosphatase und Transglutaminase sind bereits nach wenigen Minuten in der Pellikel zu finden (Hannig C. et al. 2005b, 2008b). Die enzymatische Vernetzung und Dephosphorylierung ist für die Pellikelreifung wichtiger als die Proteolyse (Hannig C. et al. 2008b).

In einer Studie von Delius et al. zeigte das individuelle Proteom der Probanden eine hohe Konsistenz an aufeinander folgenden Tagen, woraus geschlossen werden konnte, dass dieses sehr gut reproduzierbar ist (Delius et al. 2017).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Pellikel sind die Lipide. Das Wort „Lipide“ umfasst einen großen Bereich verschiedenster Substanzen, welche im Allgemeinen als unpolare Moleküle definiert werden, die in Wasser unlöslich und in organischen Lösungen wie Alkohol und Ether löslich sind (Kensche et al. 2013; Reich et al. 2013). Sie unterscheiden sich in Charakteristika, Struktur und Funktionalität (Reich et al. 2013). Im Wesentlichen sind neutrale Lipide, Glycolipide und Phospholipide in der Pellikel zu finden (Slomiany et al. 1986). Zu den neutralen Lipiden zählen Cholesterol, Cholesterinester, Mono-, Di-, Triglyceride und freie Fettsäuren (Slomiany et al. 1986). Die häufigsten Glycerolipide sind Hexa-, Okta-, Tri – und Tetraglycosyl, und die häufigsten Phospholipide sind Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin (Slomiany et al. 1986; Lendenmann et al. 2000). Die wichtigste Funktion der Lipide in der Pellikel ist der Schutz gegen Karies (Slomiany et al. 1986). Slomiany et al. stellten in einer Studie, in der sie den Lipidgehalt der Pellikel von kariesresistenten mit dem von kariessensitiven Individuen verglichen, deutliche Unterschiede

fest. Bezogen auf die Glycolipide ununterschieden sich die beiden Gruppen nicht wesentlich, jedoch zeigte sich in der Pellikel der kariesresistenten Probanden mehr Cholesterol, Cholesterinester und Sphingomyelin, während die der kariessensitiven Gruppe mehr freie Fettsäuren und Phosphatidylethanolamin aufwies. Man beobachtete, dass Lipide einen Schutz gegenüber kariogenen Mikroorganismen bzw. gegen die von diesen gebildete Milchsäure bieten. Der Grund dafür ist, dass die Lipide die Diffusion der Milchsäure verzögern. Diese Eigenschaft war bei den kariesresistenten Probanden um 45% gesteigert, verglichen mit den kariessensitiven. Als sie die Lipide versuchsweise komplett aus der Pellikel entfernten, beobachteten sie eine bis zu 50%ige Reduktion dieser protektiven Eigenschaft (Slomiany et al. 1986).

Einer der maßgeblichsten Bestandteile der Lipide und Gegenstand der jüngsten Studien sind die Fettsäuren, die vor allem für deren verschiedene physikalische und metabolische Eigenschaften verantwortlich sind (Reich et al. 2013). Reich et al. verglichen 2013 die Fettsäureprofile und den Fettsäuregehalt der Pellikel von zehn verschiedenen Probanden nach 3 bis 240 min. Die Fettsäureprofile der Pellikel unterschieden sich nur marginal voneinander, womit gezeigt wurde, dass diese charakteristisch für die biologische Struktur und somit unabhängig vom Individuum sind. Was sich jedoch mit zunehmender Zeit sehr wohl änderte, ist die Dicke der Pellikel und somit deren Fettsäuregehalt. Diese Tatsache führten die Autoren auf das allgemeine Pellikelwachstum in diesem zeitlichen Rahmen zurück. Eine weitere Erkenntnis der Studie bezieht sich auf den Vergleich der Fettsäureprofile des Speichels mit denen der Pellikel. Hier zeigten sich deutliche Unterschiede, was den Schluss nahelegte, dass die Adsorption der Lipide, analog zu den Aminosäuren und Proteinen, ein hoch selektiver Prozess ist (Lendenmann et al. 2000). Das wurde auch dadurch bestätigt, dass die Fettsäuren nicht äquivalent zu der im Speichel angebotenen Menge adsorbiert wurden (Reich et al. 2013).

Auch Kohlenhydrate, besonders Glucose, Mannose, Galactose, Fructose und Glucosamine, sind Bestandteile der dentalen Pellikel (Hay 1969; Lendenmann et al. 2000). Dass auch die Adsorption der Kohlenhydrate aus dem Speichel ein selektiver Prozess ist, zeigten Mayhall & Butler. Sie verglichen deren Gehalt in der Pellikel mit dem im Speichel und fanden hierbei signifikante Unterschiede in Quantität und Qualität. Es zeigte sich, dass die Pellikel wesentlich mehr Glucose und signifikant weniger Mannose und Glucosamin enthält als der Speichel, wobei die Differenz des Glucosegehaltes besonders groß ist. Da in der Pellikel jedoch keine freie Glucose gefunden wurde, wird vermutet, dass diese hauptsächlich kovalent an Glycoproteine und vielleicht auch Glycolipide gebunden ist (Mayhall & Butler 1976).

Generell ist festzuhalten, dass es sich bei der Bildung der Pellikel um einen dynamischen, hoch selektiven und kontrollierten Prozess handelt (Delius et al. 2017). Während einige Moleküle sehr schnell an den Schmelz binden und ihre Konzentration bzw. Aktivität dann konstant bleibt, adsorbieren andere nur langsam und erreichen keine Sättigung (Vacca Smith & Bowen 2000). Wieder andere binden schnell an den Schmelz und desorbieren ebenso schnell wieder bzw. verlieren ihre Aktivität (Vacca Smith & Bowen 2000).

2.2.2 Funktion

Die vorrangige Funktion der Pellikel besteht im Schutz der darunterliegenden Zahnhartsubstanz (Hannig M. & Balz 1999). Dieser Schutz besteht zum einen gegen Erosion durch den Angriff von Säuren aus der Nahrung, zum anderen gegen Abrasion durch Nahrungsbestandteile und gegen Attrition (Hannig M. & Balz 1999; Lendenmann et al. 2000). Des Weiteren nimmt man an, dass die Pellikel als Lubrikant wirkt und dass sie somit die Friktion zwischen den Zähnen selbst und zwischen den Zähnen und der Mundschleimhaut verringert (Lendenmann et al. 2000).

Die Zahnhartsubstanz nimmt großen Schaden durch die Erosion, also die Demineralisation durch direkte Einwirkung von Säuren (Slomiany et al. 1986; Lendenmann et al. 2000; Hannig C. et al. 2009). Hierbei liegt besonderes Augenmerk auf verschiedenen Säuren aus der Nahrung und auf der Milchsäure als metabolisches Endprodukt kariogener Mikroorganismen, z.B. von *Streptococcus mutans* (Zahradnik et al. 1977; Slomiany et al. 1986; Hannig C. et al. 2009).

Der Schutz gegen säurebedingte Demineralisation besteht bereits bei einer 2h Pellikel, kann aber mit zunehmender Bildungsdauer, bis zu 24 h, stetig erhöht werden (Hannig M. et al. 2003). Auch Amaechi et al. zeigten, dass die Schutzwirkung der Pellikel von ihrer Dicke abhängig ist. Dafür wurde die Pellikel von fünf Probanden an jeweils acht unterschiedlichen Lokalisationen im Zahnbogen analysiert und im Anschluss daran mit Orangensaft behandelt. Die Pellikeldicke war sowohl von den Individuen selbst, als auch von der Expositionsdauer und der Lokalisation der Proben in der Mundhöhle abhängig. Bei der anschließenden Behandlung mit Orangensaft zeigten die von der Pellikel bedeckten Proben generell wesentlich weniger Demineralisation und eine geringerer Läsionstiefe der Zahnoberfläche als die Kontrollproben. Sowohl Demineralisation, als auch Läsionstiefe, nahmen darüber hinaus mit zunehmender Pellikeldicke ab. Insofern beruht die Wirkung nicht nur auf der reinen Anwesenheit der Pellikel, sondern auch auf deren Dicke (Amaechi et al. 1999b). Des Weiteren weist die Pellikel zum Schutz gegen Demineralisation eine selektive Permeabilität auf (Zahradnik et al. 1976). Diese besteht vor

allem für bestimmte Ionen wie SCN^- , SO_4^{2-} , Ca^{2+} und PO_4^{3-} und nimmt stetig zu, je länger sich die Pellikel formieren kann (Zahradnik et al. 1976). Das heißt also, dass die Diffusionsströme der Ionen, sowohl von der Zahnschmelzoberfläche zur Mundhöhle hin, als auch umgekehrt, mit zunehmendem Alter und somit zunehmender Pellikeldicke, abnehmen (Zahradnik et al. 1976). In ihrer Funktion als semipermeable Membran ist die Pellikel auf diese Weise für die Modulation von De- und Remineralisationsprozessen der Zahnoberfläche verantwortlich (Hannig C. et al. 2009).

Die Schutzwirkung hängt im Wesentlichen von der initialen, basalen Pellikelschicht ab, da die äußere lockere Schicht sehr leicht durch Säuren ablösbar ist, und somit keinen dauerhaften Schutz bieten kann (Hannig M. 2002; Hannig C. et al. 2009). Neuste Studien zeigen, dass die initiale Pellikelbildung ein schneller Prozess ist, der in wenigen Minuten für die Akkumulation protektiver Proteine und Enzyme auf der Zahnoberfläche sorgt (Delius et al. 2017). Dies könnte bedeuten, dass sie auch ohne weitere Reifungsprozesse, die bisher als essentiell angenommen wurden, bereits ihre physikalischen Funktionen ausüben kann (Delius et al. 2017). Auch wenn die Pellikel für einen gewissen Schutz gegenüber der Erosion sorgt, kann sie die säurebedingten Veränderungen der Zahnoberfläche nicht gänzlich verhindern (Hannig M. 2002).

Eine weitere wichtige Funktion ist die Lubrikation, d.h. die Pellikel wirkt als Schmierfilm und verringert so die Friktion zwischen antagonistischen Zähnen sowie zwischen Zähnen und Mucosa (de Almeida et al. 2008; Lendenmann et al. 2000). Diese Aufgabe wird vor allem von Muzinen übernommen (Tabak et al. 1982). Muzine sind Proteine mit einem sehr hohen Kohlenhydratanteil und besitzen rheologische Eigenschaften, dazu zählen eine geringe Löslichkeit, eine hohe Viskosität, Elastizität und Klebrigkeit (Tabak et al. 1982; de Almeida et al. 2008). Diese Eigenschaften können auf verschiedene Weise beeinflusst werden, zum Beispiel durch ionische Wechselwirkungen oder durch Trennung der Disulfidbrücken, was zu einer irreversibel verminderten Viskosität der Muzine führt (Tabak et al. 1982). Die Eigenschaft der Pellikel, als Lubrikant zu wirken, hängt wesentlich von ihrem mehrschichtigen Aufbau ab, der wiederum auf ihren Selbstorganisationsprozess zurückzuführen ist (Zeng et al. 2017).

Muzine übernehmen in der Pellikel noch weitere Aufgaben, wie den Schutz vor Austrocknung und schädigenden Umwelteinflüssen sowie antimikrobielle Effekte gegen potentielle Pathogene (Tabak et al. 1982). Diese antimikrobiellen Effekte sind bedingt durch die Entfernung toxischer Substanzen, die von Bakterien gebildet wurden (Tabak et al. 1982). Hierbei handelt es sich um einen selektiven Entfernungsprozess, der womöglich durch Interaktion der Toxine mit einer spezifischen Muzin-Kohlenhydrat-Sequenz, verbunden mit der mechanischen, physikalischen Spülung durch Speichelfluss zu erklären ist (Tabak et al. 1982).

Neben den Muzinen weist die Pellikel noch weitere antibakterielle Komponenten auf (Hannig M. & Hannig C. 2007). Hierzu zählt sekretorisches IgA (Scannapieco 1994). Zwei IgA-Moleküle werden von einer J-Kette zu einem Dimer verbunden und von einer sekretorischen Komponente stabilisiert, sodass dessen Anfälligkeit gegenüber dem Angriff von Säuren und Proteasen verringert wird (Scannapieco 1994). Das sIgA gilt als eine der wichtigsten immunologischen Komponenten der Mundhöhle (Scannapieco 1994). Es bindet Antigene und beeinflusst so die Agglutination oraler Mikroorganismen, welche jetzt an ihrer Adhäsion und im weiteren Verlauf an der Kolonisation gehindert werden (Williams & Gibbons 1972). Lysozym ist dahingegen dazu in der Lage, die Bakterienzellwand zu lysieren und die Fermentation von Glucose durch orale Streptokokken zu inhibieren (Salton 1957; Wang & Germaine 1991). Somit ist es ebenso eine der wichtigsten antimikrobiellen Komponenten der Pellikel (Hannig M. & Hannig C. 2007). Histatine wirken candidizid und inhibieren die Adhäsion verschiedener Bakterien, während Cystatine als Protease-Inhibitoren das Wachstum von Streptokokken der Gruppe A hemmen (Pollock et al. 1984; Björck et al. 1989; Murakami et al. 1991). Durch Verminderung der Glucoseaufnahme inhibieren Peroxidasen den Metabolismus von *Streptococcus mutans* (Thomas et al. 1983; Scannapieco 1994). Auch Lactoferrin wirkt antibakteriell, da es Eisen bindet, welches die Bakterien für ihren Metabolismus zwingend benötigen (Scannapieco 1994; Akiyama et al. 2001).

Die Pellikel hat jedoch nicht nur protektive Eigenschaften, sondern auch pathogene Relevanz (Hannig M. & Hannig C. 2007). Die Mundhöhle ist einer der am stärksten von Mikroorganismen kolonisierten Bereiche des menschlichen Körpers (Kilian et al. 2016). Diese Kolonisation geschieht nicht zufällig, sondern entwickelt sich bereits seit Millionen von Jahren mit uns zusammen weiter (Kilian et al. 2016). Die Beziehung zwischen diesem Mikrobiom und dem Wirtsorganismus ist stets dynamisch und wird von vielen Aspekten des Lebensstils, wie z.B. Ernährung, Stress und Tabakkonsum beeinflusst (Kilian et al. 2016). Man weiß mittlerweile, dass im menschlichen Mikrobiom die einzelligen Organismen nicht unbeeinflusst voneinander leben, sondern dass sie miteinander kommunizieren und einen Biofilm, eine stark regulierte, strukturell und funktionell organisierte Gemeinschaft bilden, die festen Oberflächen anhaftet (Davey & O'toole 2000; Li & Tian 2012; Kilian et al. 2016). Um die Möglichkeit zu haben, unsere Gesundheit zu schützen und Krankheiten abzuwehren, muss das Mikrobiom stets im harmonischen Gleichgewicht gehalten werden (Kilian et al. 2016).

Der wichtigste Pathogenitätsfaktor des dentalen Biofilms sind somit die ubiquitär vorhandenen Bakterien, welche neben protektiven auch pathogene, pro-inflammatorische Eigenschaften

haben (Hannig M. & Hannig C. 2007; Kilian et al. 2016). Sie binden leichter an die Zahnoberfläche, wenn eine Pellikel vorhanden ist, da verschiedene ihrer Komponenten als Rezeptoren für Bakterien dienen (Gibbons et al. 1976; Scannapieco 1994). Nach deren initialer Adhäsion an der Zahnoberfläche wird die Plaquebildung kontinuierlich durch das Wachstum, die Vermehrung und die Bindung weiterer Bakterien fortgesetzt (Scannapieco 1994). Die Substrate und Nährstoffe für diesen Vorgang werden vermutlich durch den Speichel bereitgestellt (Scannapieco 1994).

Es konnte beobachtet werden, dass bereits nach wenigen Stunden grampositive Bakterien in der Plaque zu finden sind, welche die Flora innerhalb der ersten zwei Tage weiterhin dominieren (Zee et al. 1996; Scannapieco 1994). Erst nach weiteren Tagen steigt der Prozentsatz der gramnegativen Kokken und Stäbchen an (Zee et al. 1996; Scannapieco 1994). Während die grampositive Gruppe fast ausschließlich aus *Streptococcus* spp. besteht, sind in der Gruppe der gramnegativen Bakterien vor allem *Capnocytophaga* spp., *Fusobakterium* spp. und *Prevotella intermedia* zu finden (Zee et al. 1996). Bereits 1966 beobachteten Theilade et al., dass sich nach ca. 9-21 Tagen ohne Mundhygiene bei allen elf Probanden einer Studie eine Gingivitis entwickelte. Sie führten diese Tatsache auf den Aufbau einer komplexen Bakterienflora zurück, denn nach genau dieser Zeit sank der Anteil der grampositiven zu Gunsten der gramnegativen Bakterien. Bereits 1-2 Tage nachdem die Mundhygiene wieder aufgenommen wurde, sanken sowohl der Plaque-, als auch der Gingiva-Index auf den Ausgangswert, und der Anteil der grampositiven Kokken und Stäbchen stieg wieder auf ca. 97% (Theilade et al. 1966). Auch konnte von Rüdiger et al. (2002) gezeigt werden, dass eine bereits bestehende Gingivitis die Proteinzusammensetzung sowie die Prävalenz von Gingivitis- und Parodontitis-assoziierten Bakterien im dentalen Biofilm beeinflusst. Während der Entzündung stieg der Anteil der Proteine und Bakterien in der Pellikel merklich an, was vor allem auf den inzisalen Flächen beobachtet werden konnte. Das legte den Schluss nahe, dass auf den gingivalen Flächen eine Sättigung erreicht werden konnte, während inzisal weiterhin Proteine und Bakterien von der Pellikel gebunden werden konnten. Verantwortlich für den veränderten Pellikelaufbau machten sie die erhöhte Fließrate der Sulcusflüssigkeit während einer Entzündung (Rüdiger et al. 2002).

Eine weitere durch Bakterien vermittelte Erkrankung in der Mundhöhle ist die Karies (Gibbons & van Houte 1975). Karies ist die häufigste Krankheit in der Mundhöhle, die vermutlich ubiquitär in der zivilisierten Bevölkerung vorhanden ist (Gibbons & van Houte 1975; Slomiany et al. 1986; Doel et al. 2004). Sie ist definiert als lokalisierte Zerstörung der Zahnhartsubstanz durch Bakterien, bzw. durch die von ihnen gebildeten Säuren (Gibbons & van Houte 1975). In

diesem Zusammenhang ist vor allem *Streptococcus mutans* zu nennen, der Kohlenhydrate zu Milchsäure verstoffwechselt, welche wiederum dazu in der Lage ist, die Zahnhartsubstanz zu demineralisieren (Gibbons & van Houte 1975; Slomiany et al. 1986). Dementsprechend ist der erste Schritt in der Entstehung von Karies und Parodontitis die Kolonisation der Zahnoberfläche mit einer mikrobiellen Flora (Siqueira et al. 2012b). Vor allem die in der komplexen Bakterienflora vorkommenden filamentösen Bakterien sind wichtige Pathogene bei der Entstehung von Karies und Krankheiten des Periodontiums, wie Gingivitis und Parodontitis (Gibbons & van Houte 1975).

Aufgrund dieser pathogenen Mechanismen, welche auch von den protektiven Mechanismen nicht verhindert werden können, ist es wichtig, die Plaque durch mechanische Reinigung der Zähne mit Zahnbürste und Zahnseide zu entfernen, um somit das Risiko für die Entstehung von Erkrankungen wie Karies und Parodontitis zu minimieren (Theilade et al. 1966).

2.2.3 Subsurface Pellikel

Meckel war 1965 der erste, der neben der oben dargestellten oberflächlichen Pellikel eine sogenannte „subsurface Pellicle“ beschrieb. Laut seinen Beobachtungen handelt sich hierbei um eine ca. 1-3 μm dicke, bereits im Lichtmikroskop erkennbare Pellikelschicht unterhalb der Zahnoberfläche. Sie besteht aus Speichelbestandteilen, wie Proteinen und Lipiden, hat ein inhomogenes faseriges Erscheinungsbild und ist in den Schmelz eingebettet. Dieses fibröse Netzwerk liegt der oberflächlichen Pellikel an ihrer Unterseite an, und ist möglicherweise für die feste Anlagerung deren basaler Schicht an den Schmelz verantwortlich (Meckel 1968). Das erklärt auch, dass ebendiese Basalschicht, wie zuvor beschrieben, bei einem Angriff von Säuren bestehen blieb (Hannig C. et al. 2009). Meckel beobachtete des Weiteren, dass sich die subsurface Pellikel nur auf porösen Oberflächen bilden kann, wie es z.B. bei white spot Läsionen im Schmelz der Fall ist. Er erkannte, dass sie dazu in der Lage ist, die Poren regelrecht auszufüllen (Meckel 1968). Auch Hannig et al. konnten in einer Studie darstellen, dass sich nach einem Säureangriff, unterhalb der verbliebenen basalen Pellikelschicht, Lacunen in der Schmelzoberfläche bilden. Diese zeigten sich einige Minuten später durch Reorganisationsprozesse der Pellikel von organischem Material aufgefüllt (Hannig C. et al. 2009). Leach und Saxton beobachteten 1966, dass sich die subsurface Pellikel vor allem auf Approximalflächen, und weniger auf Lingual- oder Labialflächen bildete (Leach & Saxton 1966). Meckel vermutete, dass die Approximalflächen vermehrt dem Säureangriff ausgesetzt sind, was zur Folge hat, dass diese poröser werden (Meckel 1968).

Ebenfalls 1966 entdeckten Frank und Brendel eine „verfestigte organische Matrix“, wie sie sie nannten, unterhalb einer vermeintlich intakten Schmelzoberfläche. Es zeigte sich, dass die Oberfläche durch Mikroläsionen, nicht größer als 1 µm, so beschädigt war, dass kariogene Mikroorganismen unterhalb der Oberfläche die Apatitkristalle zerstören, und den Schmelz demineralisieren konnten. Diese Läsionen wurden mit organischem Material aufgefüllt, und es entstand eine „verfestigte organische Matrix“, die mit der subsurface Pellikel beinahe identisch ist. Der Unterschied besteht lediglich darin, dass in ersterer die Poren sehr groß sind, und dass die fibrilläre Struktur mit fortgeschrittener Schmelzschädigung verschwindet (Frank & Brendel 1966).

Auf nicht porösem Material, wie es bei unbeschädigtem Schmelz der Fall ist, ist eine Bildung der subsurface Pellikel nicht möglich (Meckel 1965, 1968). Das führte zu dem Schluss, dass es sich bei ihrer Bildung um den ersten Abwehrmechanismus des Organismus gegenüber Karies handelt, der auf Adsorption und anschließender Infiltration der Speichelbestandteile in oberflächliche, erosive Initialläsionen des Schmelzes basiert (Meckel 1965). Hannig et al. vermuteten, dass die Füllung der Lacunen entweder eine Leitschiene für Remineralisationsprozesse darstellt oder dass sie, im Gegenteil dazu, die Rekonstruktion schmelzartiger Strukturen erschweren könnte (Hannig C. et al. 2009).

2.3 Polyphenole

Wie der Name bereits vermuten lässt, sind Polyphenole Moleküle, bestehend aus mehreren einfachen Phenolen, zu denen unter anderem Phenol selbst und Thymol zu zählen sind (Bravo 1998). Sie bestehen dementsprechend aus aromatischen Ringen, Hydroxylgruppen und aus strukturellen Elementen, welche diese miteinander verbinden (Manach et al. 2004). Bei Polyphenolen, von denen es tausende verschiedene Arten gibt, handelt es sich um Sekundärmetabolite der Pflanzen (Bravo 1998; Koleckar et al. 2008; Myburgh 2014). Sie sind essentiell für deren Stoffwechsel, sorgen für ihre Färbung und sind beteiligt an Wachstums- und Reproduktionsprozessen (Bravo 1998). Darüber hinaus bieten sie eine gewisse Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen, UV-Strahlung und, durch den unappetitlichen, adstringierenden Geschmack, sogar gegenüber Fressfeinden (Bravo 1998; Manach et al. 2004). Die Art und die Menge des Polyphenols unterscheidet sich dabei von Pflanze zu Pflanze und auch innerhalb der Pflanze z.B. von Blatt zu Samen (Bravo 1998; Myburgh 2014).

Natürlich vorkommende Polyphenole variieren von einfachen Molekülen, wie Phenolsäuren, bis hin zu hochverzweigten Polymeren, wie etwa den Tanninen (Bravo 1998). Meistens

erscheinen sie in konjugierter Form, indem die Hydroxylgruppe an verschiedene Zuckerreste, beispielsweise Glucose, Galactose oder andere, gebunden ist (Bravo 1998).

Der begünstigende Effekt von Polyphenolen auf die Gesundheit der Menschen ist bereits seit einigen Jahren Gegenstand der Forschung. Laut Sánchez-Carranza et al. konnte z.B. eine geringere Inzidenz an Krebsleiden bei Bevölkerungsgruppen beobachtet werden, die sich sehr polyphenolreich ernähren (Sánchez-Carranza et al. 2017). Verschiedene Publikationen bestätigen unter anderem eine cardioprotektive, anticancerogene, antiinflammatorische und antimikrobielle Wirkung der Polyphenole, die vor allem auf deren antioxidative Eigenschaften zurückzuführen sind (Faria et al. 2006; Koleckar et al. 2008). Phenol selbst ist nicht antioxidativ aktiv, erst durch die Substitution eines Hydrogenatoms in para- oder ortho-Position mit einer Alkyl-Gruppe wird ihre Reaktivität gegenüber Radikalen erhöht (Shahidi et al. 1992). Freie Radikale sind reaktionsfreudige Moleküle, welche Gewebeschäden dadurch hervorrufen können, dass sie beispielsweise die Fett- und Aminosäuren der Plasmamembran oxidieren (Guo et al. 1996). Durch die Reaktion mit einem Phenol wird das Radikal reduziert und folglich von einem reaktionsaktiven in einen reaktionsträgen Zustand versetzt (Amararathna et al. 2016). Das bei der Reaktion entstehende Phenoxy-Radikal wird durch Delokalisation des unpaaren Elektrons im aromatischen Ring stabilisiert und muss folglich seinerseits nicht unbedingt mit einem weiteren Elektron reagieren (Shahidi et al. 1992). Die pathologische Kettenreaktion des freien Radikals, welche für die Zellschäden verantwortlich ist, wird somit unterbrochen (Amararathna et al. 2016). Die antioxidativen Eigenschaften des Phenols können durch Einführung einer zweiten Hydroxylgruppe in para- oder ortho-Position noch erhöht werden (Shahidi et al. 1992). Sie hängen somit stark von der Anzahl der Hydroxylgruppen im Molekül ab (Dziedzic & Hudson 1983).

Auch in der Industrie finden Polyphenole, in ihrer Funktion als natürliche Konservierungs- und Färbemittel, vielfach Anwendung, z.B. als Inhaltsstoffe von Papier, Farben, Kosmetik, Lebensmitteln und sogar Medikamenten (Bravo 1998).

2.3.1 Tannine

Bei Tanninen handelt es sich um Polyphenole, die in vielen verschiedenen höher entwickelten Pflanzenfamilien, wie zum Beispiel in der Kastanie, der Eiche und der Weinrebe (*Vitis vinifera*) vorkommen (Faria et al. 2006; Khanabae & Ree 2001; Soares et al. 2011). Hier können sie in nahezu allen Teilen der Pflanze, von den Blättern über die Rinde bis hin zu den Wurzeln und Samen gefunden werden (Faria et al. 2006; Khanabae & Ree 2001; Soares et al. 2011).

Dementsprechend sind sie in den meisten pflanzlichen Lebensmitteln, beispielsweise Gemüse, Früchte und Nüsse, und in deren Erzeugnissen, wie Tee, Kakao und Wein, ubiquitär vorhanden und sind somit ein integraler Bestandteil der menschlichen Nahrung (Bravo 1998). Eine erhöhte Tannin-Produktion kann bei einer Erkrankung der Pflanze beobachtet werden (Khanbabae & Ree 2001).

Tannine können anhand ihrer strukturellen und chemischen Eigenschaften grob in zwei große Gruppen klassifiziert werden, die hydrolysierbaren und die kondensierten Tannine, wobei letztere auch als Proanthocyanide bezeichnet werden (Khanbabae & Ree 2001).

Die hydrolysierbaren Tannine können, wie der Name schon sagt, leicht mit Säuren, Laugen oder Enzymen hydrolysiert werden (Bravo 1998). Sie werden weiter in Gallotannine, mit nur einer Galloyl-Gruppe, und Ellagitannine, mit mindestens zwei Galloyl-Gruppen, unterteilt (Khanbabae & Ree 2001).

Die kondensierten Tannine entstehen durch sukzessive Kondensation einzelner Molekül-Bausteine, und erreichen somit einen Polymerisationsgrad von 2 bis über 50 Bausteinen (Khanbabae & Ree 2001). In der Natur sind sie am weitesten verbreitet und repräsentieren folglich die größte Komponente in der menschlichen Nahrung (Koleckar et al. 2008).

Tannine, die keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden können, bezeichnet man als komplexe Tannine (Khanbabae & Ree 2001). Sie bestehen aus einem Catechin-Rest, welcher entweder an ein Gallotannin oder an ein Ellagitannin gebunden ist (Khanbabae & Ree 2001).

Tanninsäure

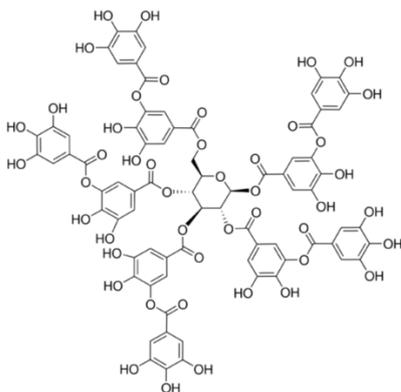


Abb. 1: Strukturformel der Tanninsäure

Die Tanninsäure (Abb. 1) besitzt nur geringe Azidität und ist das wohl bekannteste Polyphenol aus der Gruppe der hydrolysierbaren Tannine (Bravo 1998; Hertel et al. 2017).

Sie wirkt inhibitorisch auf Bakterien des Magen-Darm-Traktes, wie zum Beispiel *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* und *Enterobacter cloacae* (Akiyama et al. 2001). Das liegt

vermutlich daran, dass Tanninsäure einen Chelatkomplex mit Eisenionen bildet, und diese somit für Mikroorganismen, welche Eisen zum Überleben benötigen, unzugänglich macht (Akiyama et al. 2001).

In der Funktion als Antioxidans und aufgrund des adstringierenden Geschmacks findet die Tanninsäure immer mehr Beachtung in der Lebensmittelindustrie, so zum Beispiel als Zusatz in Säften, Süßigkeiten, Kaugummis und Backmischungen (Bravo 1998; Hertel et al. 2017; Pelvan et al. 2018). Der adstringierende Geschmack kommt dadurch zustande, dass die Tannine unlösliche Komplexe mit Kohlenhydraten und Proteinen, wie sie im Speichel zu finden sind, eingehen (Bravo 1998).

Ishtikhar et al. konnten mit Hilfe verschiedener spektroskopischer und kalorimetrischer Techniken feststellen, dass die Bindung an Tanninsäure die antioxidativen Eigenschaften des Serum-Albumins in Säugetieren enorm steigern kann (Ishtikhar et al. 2018). Albumin ist ein von der Leber produziertes Protein, welches in allen Geweben und Sekreten des Körpers vorhanden ist (Ishtikhar et al. 2016). Durch diese Eigenschaft ist Tanninsäure folglich im ganzen Körper als Radikalfänger aktiv (Ishtikhar et al. 2018).

Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass Polyphenole, in erster Linie die Tanninsäure, durch Induktion des Zellzyklusarrestes sowie der Apoptose, und durch Reorganisation der Microtubuli, eine stark antiproliferative Wirkung hat (Sánchez-Carranza et al. 2017). Im Rahmen dieser Studie von Sánchez-Carranza et al. konnte sogar gezeigt werden, dass Polyphenole eine Selektivität für Krebszellen aufwiesen, denn sie wirkten nur auf entartete, maligne hepatozelluläre Zellen, nicht aber auf gesunde Hepatozyten antiproliferativ (Sánchez-Carranza et al. 2017).

Auch in der Zahnmedizin konnten Auswirkungen der Tanninsäure beobachtet werden, denn nach deren Applikation erschien die dentale Pellikel elektronendichter und zudem dicker (Rehage et al. 2017). Dementsprechend verbesserten sich auf diese Weise die protektiven Eigenschaften der Pellikel, sowohl im Hinblick auf erosive Demineralisation des Schmelzes, als auch auf die Anheftung von Bakterien an die Zahnhartsubstanz (Hertel et al. 2017).

Epigallocatechingallat (EGCG)

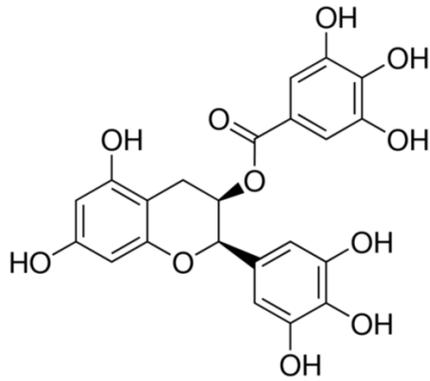


Abb. 2: Strukturformel von EGCG

EGCG (Abb. 2) ist Hauptbestandteil des grünen Tees und gehört zu den kondensierten Tanninen (Koleckar et al. 2008). Es wirkt antioxidativ, indem es den Verbrauch von Antioxidantien im Körper verzögert, und indem es selbst als Radikalfänger fungiert (Murakami et al. 2002; Tipoe et al. 2007). EGCG ist nachweislich dazu in der Lage, Chelat-Komplexe mit Metallionen einzugehen, was die metall-katalysierte Bildung freier Radikale durch die Fenton-Reaktion verhindert (Amararathna et al. 2016).

Die anticancerogene Wirkung des EGCG konnte in verschiedenen Tierexperimenten gezeigt werden, bei denen positive Effekte auf das Wachstum des Coloncarzinoms sowie auf dessen Bildung von Leber- und Lungenmetastasen auftraten (Yuan et al. 2007). Auch inhibitorische Effekte auf das Entstehen von Hautkrebs wurden im Tierversuch nachwiesen (Agarwal et al. 1992). In einer Studie mit vier Probanden konnten Shanafelt et al. des Weiteren einen positiven Effekt auf low grade B-Zell Malignome bestätigen. Die vier Probanden waren an low grade B-Zell Malignomen erkrankt und nahmen eigeninitiativ EGCG-haltige Substanzen zu sich. Schon nach kurzer Zeit zeigte sich röntgenologisch eine deutliche Regression der Lymphome im CT, was dazu führte, dass eine weitere Therapie, zumindest bis zum Ende der Studie, vermieden werden konnte. Zudem berichtete keiner der vier Patienten über unerwünschte Nebenwirkungen (Shanafelt et al. 2006).

EGCG wirkt des Weiteren antiinflammatorisch und bakterizid (Ikigai et al. 1993; Tipoe et al. 2007). Ikigai et al. beobachteten die bakteriziden Eigenschaften insbesondere gegen grampositive Bakterien. EGCG interagiert mit der grampositiven Zellmembran und wirkte störend auf die Lipiddoppelschicht ein, wodurch deren Barrierefunktion aufgehoben wurde. Für die vermehrte Resistenz der gramnegativen Bakterien war der zusätzliche Widerstand durch das Vorhandensein einer weiteren äußeren Zellmembran verantwortlich, welche aufgrund der

enthaltenden Lipopolysaccharide auf ihrer Oberfläche stark negativ geladen ist (Ikigai et al. 1993). Antientzündlich wirkt EGCG durch seinen inhibitorischen Effekt auf die Expression von COX-2 und NO, welche als proinflammatorische Mediatoren agieren (Tipoe et al. 2007). Im Falle einer Entzündung werden zudem auch große Mengen freier Radikale gebildet (reaktive Sauerstoffintermediate - ROS), welche das umliegende Gewebe schädigen (Tipoe et al. 2007). Auch hier wirkt EGCG der Entzündungsreaktion entgegen, indem es diese Radikale bindet und somit unschädlich macht (Tipoe et al. 2007).

Im zahnmedizinischen Bereich fand man heraus, dass die *in-vitro* erzeugte Pellikel dazu in der Lage ist, EGCG zu adsorbieren (Joiner et al. 2004). Dadurch wurde deren Entfernung durch Mundspülungen, welche Phosphatpufferlösungen und Sodium dodecyl sulfat enthielten, erschwert (Joiner et al. 2004).

Auch führt die Behandlung mit EGCG dazu, dass die Pellikel, ebenso wie bei der Tanninsäure, sowohl elektronendichter, als auch dicker erscheint (Rehage et al. 2017).

Außerdem wurden nach der Behandlung der Zahnoberfläche mit EGCG Veränderungen im Proteom der Pellikel beobachtet, welche vermutlich für deren erhöhte Widerstandsfähigkeit nach der Behandlung mit Polyphenolen verantwortlich sind (de Souza-e-Silva et al. 2017).

EGCG gilt als gut verträglich und zeigt wenige unerwünschte Nebenwirkungen (Ullmann et al. 2003; Shanafelt et al. 2006).

2.3.2 Experimentelles Hopfenextrakt

Extrakte des Hopfens (*Humulus lupulus*) sind reich an Polyphenolen, wie z.B. der Gallussäure, der Chlorogensäure sowie des Epicatechin (Kobus-Cisowska et al. 2019). Hopfen ist durch seinen Einsatz beim Brauen von Bier weltweit bekannt, denn es verleiht dem Getränk sein charakteristisches Aroma und den Geschmack (Zanoli & Zavatti 2008).

In der traditionellen Medizin werden Hopfen-Zubereitungen bereits viele Jahre aufgrund des leicht sedativen Effekts gegen milde Schlafstörungen und Nervosität sowie durch seine Bitterstoffe als magenanregend eingesetzt (Zanoli et al. 2005; Zanoli & Zavatti 2008).

In einigen *in-vitro*-Studien konnten auch gesundheitsfördernde Eigenschaften des Hopfens nachgewiesen werden. Er wirkt antioxidativ, antiinflammatorisch und, vor allem gegen verschiedene Staphylokokkenspezies, antimikrobiell (Kobus-Cisowska et al. 2019). Zudem wirkt er hemmend auf die Cholinesterasen und könnte somit z.B. neurodegenerativen Zivilisationskrankheiten vorbeugen und diese therapieren (Kobus-Cisowska et al. 2019). Einige Bestandteile des Hopfens wirken sogar chemopräventiv gegenüber verschiedenen

Krebserkrankungen, denn sie sind unter *in-vitro*-Bedingungen dazu in der Lage, die Proliferation von Krebszellen zu inhibieren, die Apoptose zu induzieren und die Metastasierung zu supprimieren (Wei et al. 2018; Ambrož et al. 2019).

Aufgrund dieser zahlreichen biologischen Aktivitäten kann in den letzten Jahren beobachtet werden, dass die Anzahl der auf dem Markt verfügbaren Produkte, die Hopfenextrakt enthalten, angestiegen ist (Vázquez Loureiro et al. 2019).

Auch im Bereich der Zahnmedizin konnten bereits einige Auswirkungen des Hopfen beobachtet werden. Shinada et al. (2007) konnten in einer *in-vivo*-Studie zeigen, dass die Benutzung einer Mundspüllösung aus Hopfenblättern, einem Abfallprodukt des Bierbrauens, die Neubildung von dentaler Plaque, wie auch die Menge der oralen Streptococcus mutans deutlich verringerte (Shinada et al. 2007; Tanaka et al. 2014). Ebenso konnte im *in-vitro*-Experiment gezeigt werden, dass die Polyphenole des Hopfens die Zellen des periodontalen Ligaments vor der Zytotoxizität von Porphyromonas gingivalis schützten (Inaba et al. 2005). Einer weitere *in-vitro*-Studie konnte die hemmenden Eigenschaften des Hopfens, vor allem auf gram-positive Bakterien bestätigen. Die Hopfenextrakte wirkten antimikrobiell gegen kariogene und periodontale Pathogene sowie gegen Candida-Spezies (Pilna et al. 2015).

2.4 Ätiologie der Erosion

Die dentale Erosion ist definiert als der oberflächliche Verlust von Zahnhartsubstanz aufgrund chemischer Prozesse ohne die Beteiligung von Bakterien (Eccles 1979). Dementsprechend ist der wesentliche ätiologische Faktor die Einwirkung von Säuren, die entweder extrinsischen oder intrinsischen Ursprungs sein können (Eccles 1979; Jarvinen et al. 1991). Zu den extrinsischen Säuren zählen die, die dem Körper von außen zugeführt werden, in Form von Medikamenten wie Vitamin C-Tabletten, durch Umwelteinflüsse, wie die eingeatmete Luft, und in Form von demineralisierenden, sauren Nahrungsbestandteilen, wie beispielsweise Zitrusfrüchten oder Soft- und Sport-Drinks (Jarvinen et al. 1991). Als intrinsische Säure ist fast ausschließlich die Magensäure zu nennen, die durch Sodbrennen, Aufstoßen oder häufiges Erbrechen, im Rahmen von psychischen Erkrankungen wie Anorexia nervosa, in die Mundhöhle gelangt (Jarvinen et al. 1991). Erosiver Verschleiß kann, je nach Ursache, auf allen Oberflächen der Zähne beobachtet werden, ist jedoch am ausgeprägtesten auf allen okklusalen und fazialen Seiten (Jaeggi & Lussi 2006). Approximale Erosionen sind schwer zu identifizieren und wahrscheinlich auch selten, wohingegen die zervikale Schulter-Formation und das umgedrehte V-Zeichen der oberen Inzisiven eher üblich sind (Johansson et al. 2012).

Auch das sogenannte „copping“, die Erosion der Höckerspitzen der ersten Molaren, meistens im Unterkiefer, die bis weit ins Dentin reichen können, ist ein häufig zu beobachtendes Phänomen (Johansson et al. 2012).

Bis zu einem gewissen Grad wird die Erosion als physiologisch angesehen und beginnt, sobald die Zähne in die Mundhöhle durchgebrochen sind, und die oben genannten Faktoren auf deren Oberfläche einwirken (Lussi et al. 2002, 2004). Sowohl die Milchzähne, als auch die Zähne der zweiten Dentition sind betroffen, wobei Milchzähne aufgrund des wesentlich dünneren Schmelzmantels größeren Schaden nehmen, da das Dentin hier schneller erreicht wird (Jaeggi & Lussi 2006). Nicht nur bei Milchzähnen kann es in ausgeprägten Fällen sogar dazu kommen, dass die Pulpa durchscheint (Johansson et al. 2012).

Das Zahnhartgewebe besteht aus stark mineralisiertem Schmelz und aus Dentin und Zement, die wiederum aus einem größeren Teil organischer Matrix bestehen (Lussi & Carvalho 2015). Die mineralischen Kristalle bestehen aus Hydroxylapatit, das sich aus Kalzium und Phosphat zusammensetzt (Lussi & Carvalho 2015). Wenn sich genug Ca^{2+} , PO_4^{3-} , OH^- und F^- -Ionen in der unmittelbaren Umgebung des Zahnes befinden, entsteht ein chemisches Gleichgewicht zwischen den mineralischen Kristallen und der umgebenden Lösung (Lussi & Carvalho 2015). Während einer Säureattacke hingegen greifen die H^+ -Ionen, die bei Kontakt mit Wasser aus der Säure dissoziieren, unter anderem die Hydroxylionen oder Carbonate des Apatit der Zahnhartsubstanz an (Featherstone & Lussi 2006; Lussi & Carvalho 2015). Saure Nahrungsbestandteile mit niedrigem pH-Wert und erosivem Potential beinhalten zudem generell nur wenig Ca^{2+} - und PO_4^{3-} - Ionen (Lussi & Carvalho 2015). Sie sind somit, verglichen mit dem Zahnhartgewebe, untersättigt, was jetzt dazu führt, dass sich diese Ionen entlang des Diffusionsgradienten vermehrt aus dem Zahn lösen (Lussi & Carvalho 2015). Generell kann man also sagen, dass bei der Erosion der pH-Wert von maßgeblicher Bedeutung ist (Lussi & Carvalho 2015). Es gibt auch Säuren, wie z.B. die Zitronensäure, die eine komplexere Wirkweise haben (Featherstone & Lussi 2006). Gelöst in Wasser liegen sie als Gemisch aus Hydrogenion (H^+) und Säureanion vor (Featherstone & Lussi 2006). Das H^+ agiert wie oben beschrieben und greift die Mineralkristalle der Zahnoberfläche direkt an, während das Anion einen Komplex mit Ca^{2+} -Ionen eingeht und diese somit aus dem Speichel entfernt (Featherstone & Lussi 2006). Der dementsprechend schneller untersättigte Speichel führt dazu, dass zusätzlich Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionen, aus der Zahnoberfläche herausgelöst werden (Featherstone & Lussi 2006). Durch diese zweifache Wirkung sind solche Säuren besonders schädigend für die Zähne (Featherstone & Lussi 2006).

Neben der Erosion ist auch die mechanische Abnutzung durch Abrasion, also durch Nahrungsbestandteile und Attrition, verursacht durch antagonistische Zähne, verantwortlich für den Substanzverlust der Zähne (Eccles 1979). Es ist beinahe unmöglich, klinisch festzustellen, inwiefern die reine Erosion verantwortlich für die Defekte ist (Eccles 1979). Allerdings konnte beobachtet werden, dass, wenn mechanischer Stress auf die Zahnoberfläche wirkt, die Progression des erosiven Defektes schneller voranschreitet (Jaeggi & Lussi 2006).

2.5 Fragestellung

In Bezug auf Bildung und Funktion der dentalen Pellikel liegen bereits sehr viele Informationen vor. Es handelt sich zum größten Teil um *In-vitro*-Untersuchungen mit dem Ergebnis, dass die Pellikel die Zahnhartsubstanz vor erosiven und abrasiven Substanzen schützt (Hannig M. & Balz 1999; Lendenmann et al. 2000). Auch konnte gezeigt werden, dass dieser Schutz erheblich verbessert werden kann, wenn die Pellikel mit Polyphenolen modifiziert wird (Hertel et al. 2017; de Souza-e-Silva et al. 2017). Bisher bezogen sich alle Versuche in diesem Bereich auf die unversehrte Zahnhartsubstanz, welche jedoch in der Realität nur selten zu finden ist. In dieser Studie soll die Schutzfunktion der modifizierten Pellikel auf bereits erosiv vorgeschädigtem Zahnschmelz untersucht werden. Es geht also in dem hier geplanten Versuch um das Verhalten der subsurface Pellikel, zu der bisher noch nicht sehr viel bekannt ist.

Ziel dieser Studie war es somit, die Hypothese zu testen, dass die Schutzfunktion der subsurface Pellikel auf erodiertem Zahnschmelz durch Modifikation mit Polyphenolen gegenüber einem erneuten Säureangriff verbessert werden kann. Bei den in dieser Studie verwendeten Polyphenolen handelte es sich um Tanninsäure, Epigallocatechingallat und um ein experimentelles, wässriges Hopfenextrakt. Die Proben wurden mit Hilfe des Raster- und Transmissionselektronenmikroskops analysiert und beurteilt.

3. Material und Methode

3.1 Studiendesign

Es handelt sich bei der hier vorliegenden Studie um eine *In-situ/Ex-vivo*-Studie mit klinisch-experimentellem Design.

Der Versuchsaufbau beginnt *ex-vivo* mit dem Anätzen der bovinen Schmelz-Prüfkörper, um eine poröse Oberfläche zu schaffen, sodass sich im nächsten Schritt *in-vivo* eine subsurface Pellikel bilden kann. Hierfür werden die Prüfkörper auf Zahnschienen aufgebracht und von der Probandin für einen definierten Zeitraum intraoral getragen. Im Anschluss daran sollte die weitere Behandlung der Prüfkörper *ex-vivo* erfolgen. Diese werden nun mit Polyphenolen behandelt und danach, um die verbesserte Protektivität der modifizierten Pellikel zu demonstrieren, erneut angeätzt.

Die Prüfkörper wurden von einer anamnestisch- und zahngesunden Probandin getragen (Votum der Ethik-Kommission 238-03/2016).

3.2 Gewinnung der Pellikel in-situ

3.2.1 Herstellung der Prüfkörper

Um die für den Versuch benötigte Pellikel zu gewinnen, wurden Prüfkörper aus Rinderzahnschmelz benötigt.

Bei den Rinderzähnen handelte es sich um Zähne der zweiten Dentition, welche im Schlachthof in Zweibrücken entnommen wurden. Im Anschluss an die Extraktion wurden die Zähne in 0,1%iger Thymollösung bei 4°C gelagert. Entnommen wurden die Zähne nur bei Rindern, welche nach entsprechenden Untersuchungen zum Verzehr weiterverarbeitet wurden, da hier das Risiko der Infektion mit boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) ausgeschlossen werden konnte.

Da zur Prüfkörpergewinnung die Labialfläche der unteren Schneidezähne genutzt wird, wurde diese im erste Schritt der Herstellung mithilfe einer Diamanttrennscheibe aus den extrahierten Rinderzähnen herausgetrennt, um anschließend unter Verwendung einer Schleifmaschine (Buehler, Phoenix 3000) standardisiert zu werden. Alle Prüfkörper wurden mit Silikat-Schleifpapier (Buehler-Met II) unter Wasserkühlung auf eine Größe von 4 x 3 x 1,5 mm (Abb.3) reduziert und der Schmelz wurde mit 350 Umdrehungen/min poliert. Für diese Politur wurde

Schleifpapier mit aufsteigender Körnung von 240 Grit bis 2500 Grit verwendet. Es war darauf zu achten, dass die Schmelz-Prüfkörper zu 2/3 aus Schmelz und zu 1/3 aus Dentin bestehen. Das Dentin musste zur Stabilisierung des spröden Schmelzes in einer dünnen Schicht belassen werden. Außerdem waren alle Flächen parallel und plan, und alle Winkel betragen 90°. Nach der Politur wurde jeder Prüfkörper unter dem Mikroskop (Motic SMZ-168 series) auf eine glatte, unversehrte Oberfläche ohne Schliffacetten kontrolliert.

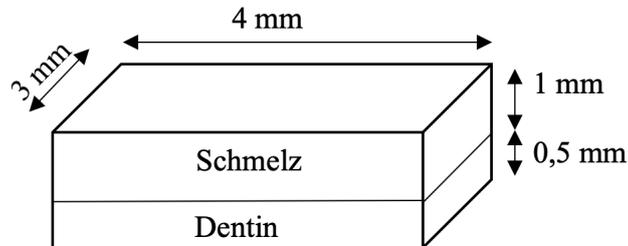


Abb. 3: Schematische Zeichnung eines geschliffenen Prüfkörpers

3.2.2 Herstellung der Schienen

Um die bovinen Schmelz-Prüfkörper intraoral applizieren zu können, wurden sie auf Zahnschienen aufgebracht. Zur Herstellung dieser Schienen wurden, nach zuvor erfolgter Abdrucknahme mit Alginat (Pluragin Elastic, Pluradent AG & Co KG, Offenbach), Modelle aus Superhartgips (Die Stone, Heraeus Kulzer Inc., NY USA) erstellt. Auf diesen wurden transparente Oberkiefer-Schienen aus Duran (Polyethylenterephthalat-Glycol Copolyester (PET-G), Scheu Dental GmbH, Iserlohn) im Tiefziehverfahren angefertigt. Sie reichten jeweils vom Eckzahn bis zum zweiten Molar.

3.2.3 Montieren der Prüfkörper auf den Schienen

Sowohl die Prüfkörper, als auch die Schienen, wurden vor dem Montieren gereinigt und desinfiziert. Die Schienen wurden hierfür zunächst mit handelsüblicher Zahnpasta von groben Unreinheiten befreit und anschließend in 70%igem Isopropylalkohol (Otto Fischer GmbH & Co KG) im Ultraschallbad behandelt.

Die Prüfkörper wurden zunächst 2-3min mit Natriumhypochlorit (3%NaOCl) und anschließend unter fließendem Wasser gespült. Es folgte ein fünf-minütige Exposition im Ultraschallbad sowie eine 15-minütige Spülung mit Isopropylalkohol (70%). Der abschließende Schritt war eine dreimalige Spülung mit sterilem Wasser (Aqua B. Braun Ecotainer, B. Braun Melsungen AG). In diesem Zustand sollten die Prüfkörper bei 4 °C mindestens 6 h, jedoch maximal 3 d aufbewahrt werden.

Da es im hier vorliegenden Versuch um das Verhalten der subsurface Pellikel auf bereits erodiertem Schmelz ging, wurden die Prüfkörper jetzt 30s mit Phosphorsäure (37%, Gel Etchant, Kerr Italia) behandelt, um diesem Zustand möglichst nahe zu kommen. Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurden, entsprechend dem Versuchsprotokoll, an dieser Stelle einige Kontrollproben nicht angeätzt.

Die trockenen Schienen wurden auf das Gipsmodell aufgebracht. Auf der bukkalen Seite wurde ein A-Silikon (President micro System, light Body, Coltène, Schweiz) aufgetragen, und die Prüfkörper mussten nun zügig und vorsichtig mittels Pinzette hierauf appliziert werden. Es war darauf zu achten, diese keinesfalls auf der Schmelzseite zu berühren oder zu beschmutzen. Die Prüfkörper sollten, mit Ausnahme der polierten Seite, vollständig von dem Silikon gefasst sein. Zur besseren Retention des Silikons auf den Schienen wurden diese auf der bukkalen Seite perforiert. Es wurden bis zu 6 Prüfkörper pro Seite aufgebracht.

3.2.4 Intraorale Exposition der Schienen

Zur Gewinnung der Pellikel wurden die Schienen, nach mindestens 6-stündiger Lagerung bei 4°C, für 2h intraoral getragen.

Sie wurden eine Stunde nach Reinigung der Zähne mit einer handelsüblichen Zahnpasta eingesetzt und während der Tragedauer wurde auf Nahrungs- sowie Flüssigkeitsaufnahme verzichtet. Dies stellte sicher, dass die Bildung der natürlichen Pellikel nicht verfälscht wurde. Nach Ablauf der Tragedauer wurden die Schienen vorsichtig entnommen, wobei wiederum darauf zu achten war, die Prüfkörper keinesfalls zu berühren.

3.3 Vorbereitung der Prüfkörper für die Untersuchung mittels Mikroskops

3.3.1 Rasterelektronenmikroskop

Nachdem die Prüfkörper vorsichtig von den Schienen abmontiert wurden, mussten sie mit sterilem Wasser abgespült werden, um den Speichelfilm und Schleimhautepithel zu entfernen. Jetzt wurde die Pellikel, wie im Versuchsschema vorgesehen, mit den Polyphenolen und der Phosphorsäure behandelt.

Um im Rasterelektronenmikroskop (REM) analysiert werden zu können, mussten die Prüfkörper jetzt dafür vorbereitet werden. Zu diesem Zweck fixierte man zunächst die organische Pellikel durch Inkubation bei 4°C für eine Stunde in jeweils 1 ml Fixierlösung (2%

Glutaraldehyd, 0,1%M Cacodylatpuffer). Nun erfolgte eine fünfmalige Spülung für jeweils 10 min in 1 ml Cacodylatpuffer (0,1M; Natriumcacodylat, destilliertes Wasser, 0,1N Salzsäure), und im Anschluss daran die Alkoholreihe zur Entwässerung der Prüfkörper.

Hierbei wurden die Proben zunächst zwei Mal für 10 min mit 50%igem Ethanol (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) gespült, danach für jeweils 5 min in 70, 80 und 90%igem und im letzten Schritt zwei Mal für 10 min in 100%igem Ethanol. Im Anschluss daran wurden die Proben 30 min mit Hexamethyldisilazan (HMDS, C₆H₁₂NSi₂, Acros Organics, Geel Belgien) gespült und anschließend über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

Vor dem Einsetzen der Proben in das REM (FEI XL 30 FEG ESEM, FEI-Company) wurden sie gesputtert. Bei diesem Verfahren wird eine dünne Kohleschicht auf deren Oberfläche aufgetragen. Nach dem Einsetzen in das Mikroskop konnte der Elektronenstrahl diese Kohlepartikel abtasten und so die Strukturen auf der Oberfläche abbilden. Die Prüfkörper wurden jeweils neben der Übersicht bei 25facher Vergrößerung auch noch bei 500, 2000, 5000, 10000 sowie bei 20000facher Vergrößerung beurteilt und repräsentative Bereiche wurden fotografiert. Anhand dieser Bilder konnten Aussagen zur Beschaffenheit der Pellicel getroffen werden, jedoch nicht zu deren Schichtstärke. Der Grund dafür war, dass die Prüfkörper nur von oben, nicht aber von der Seite betrachtet werden konnten. Um auch über die Schichtstärke Informationen gewinnen zu können war das Transmissionselektronenmikroskop erforderlich, da bei dieser Methode die Prüfkörper seitlich angeschliffen werden.

Einen Zwischenschritt stellten die sogenannten Blockface-Präparate dar. Hierfür wurden Die Proben zunächst für die Analyse mittels Transmissionselektronenmikroskop vorbereitet und eingebettet. Diese Verfahrensweise wird in Kapitel 3.3.2 beschrieben. Nach der Einbettung wurden die Prüfkörper seitlich angeschliffen, gesputtert und im REM betrachtet. Repräsentative Bereiche wurden fotografiert, jedoch konnte die Pelliceldicke auch hierbei nicht in gewünschtem Maße beurteilt werden. Die Proben konnten nun weiter im Transmissionselektronenmikroskop analysiert werden.

3.3.2 Transmissionselektronenmikroskop

Nach dem Abmontieren der Prüfkörper von der Schiene und dem Nachbehandeln der Pellicel mit Phosphorsäure und Polyphenolen, laut Versuchsschema, wurden die Proben nun für die Analyse im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) (Tecnai 12, FEI) vorbereitet.

Zunächst wurden die Prüfkörper für 1 h bei Raumtemperatur in Fixierlösung, bestehend aus 1% Glutaraldehyd, 1% Formaldehyd und 0,1 M Cacodylatpuffer, inkubiert. Auf die Fixierung folgte eine 3x10 min Spülung bei Raumtemperatur und anschließender Lagerung bei 4 °C in

Cacodylatpuffer (0,1 M). Die Proben wurden so mindestens über Nacht gelagert. Der nächste Schritt war die Nachfixierung mit Osmium. Hierfür wurden die Prüfkörper mit einem Gemisch aus 2% Osmiumtetroxid (OsO_4) in 0,1 M Cacodylatpuffer für eine Stunde im Dunkeln auf dem Schüttler behandelt. Darauf folgte eine 3x10 min Waschung mit sterilem Wasser (Braun).

An die Nachfixierung schloss sich die Entwässerung bei Raumtemperatur an. Hier wurden die Proben zunächst 1x10 min in 50% Ethanol, dann jeweils 2x10 min in 70, 90 und 100% Ethanol, anschließend 2x20 min in 100% Aceton und über Nacht in einem Araldit-Aceton-Gemisch (3% Beschleuniger) unter dem Abzug entwässert. Am nächsten Tag mussten die Proben in ein reines Araldit-Gemisch (2% Beschleuniger) umgesetzt werden. Hier verweilten sie ebenfalls über Nacht bei Raumtemperatur unter dem Abzug. Am dritten Tag folgte die Einbettung der Proben in Silikonformen, ebenfalls mit einem Araldit-Gemisch (2% Beschleuniger). Die Proben kamen nun für 2 d bei 65 °C zum Auspolymerisieren in den Brutschrank. Für die Gegenbettung musste zunächst der Schmelz entfernt werden. Dafür wurde die der Pellikel abgewandte Seite des Schmelzes erst mit Schleifpapier bis auf ein Minimum abgetragen, bevor die letzte dünne Schicht mit Salzsäure entkalkt und mit Araldit wieder aufgefüllt wurde. Es blieb nun lediglich die Pellikel übrig. Jetzt konnten mit dem Ultramicrotom (Leica EM UC7) 50 nm breite Ultradünnschnitte von den Proben hergestellt werden. Hierfür wurde ein Ultra-Diamantmesser (45° Diatome) benutzt. Anschließend konnten die Schnitte auf Kupfernetze mit Piloformbeschichtung aufgebracht werden, bevor als letzter Schritt nun die Nachkontrastierung mit 2% Uranylacetat in destilliertem Wasser (10 min) und Bleicitrat nach Reynolds (6 min) erfolgte. Die Proben konnten nun mit dem Transmissionselektronenmikroskop analysiert werden, wobei besonderes Augenmerk auf der Beurteilung der Pellikeldicke sowie deren Elektronendichte lag. Repräsentative Bereiche wurden auch hier bei unterschiedlichen Vergrößerungen fotografisch festgehalten.

3.4 Phosphorsäure

Bei der in diesem Versuch verwendeten Säure handelt es sich um 37%ige Phosphorsäure (Gel Etchant, Kerr Italia), die in Form eines Gels verwendet wird. Durch dessen blaue Farbe hebt es sich sehr gut vom Schmelz ab, und so kann es gezielt appliziert und restlos entfernt werden.

3.5 Vorversuche

3.5.1 Bestimmung der Einwirkdauer der Phosphorsäure

Um die Parameter des Versuchsaufbaus für die Hauptversuche festzulegen, mussten diverse Vorversuche erfolgen.

Da es in diesem Versuch um das Verhalten der subsurface Pellikel auf vorgeschädigtem, erodiertem Zahnschmelz gehen sollte, musste zunächst festgelegt werden, wie diese Erosion *in-vitro* erzeugt werden konnte. Die Frage war also, wie lange die Schmelz-Prüfkörper initial mit der Phosphorsäure (37%, Gel Etchant, Kerr Italia) behandelt werden müssen. Zu diesem Zweck wurden die polierten Schmelz-Prüfkörper mit dem Ätzgel beschickt, welches nun für eine definierte Zeit belassen wurde, um dann mit sterilem Wasser ausreichend abgespült zu werden. Die Zeiten wurden auf 10, 30 und 60 s festgelegt. Die Prüfkörper wurden nun, wie oben beschrieben, für das Rasterelektronenmikroskop vorbereitet, mit dem das Ätzmuster sehr gut dargestellt werden kann.

3.5.2 Bewertung der Pellikelschicht

Der nächste Versuch diente dazu, die *in-situ* gewonnene Pellikelschicht zu bestimmen. Es sollte nun also die Tragedauer der Schienen festgelegt werden. Hierfür wurden die Prüfkörper, wie zuvor beschrieben, für einen Zeitraum von 30 min bzw. für 2 h intraoral exponiert. Die Pellikelgewinnung erfolgte zum einen auf polierten Prüfkörpern, und zum anderen auf zuvor für 10, 30 und 60 s erodierten Prüfkörpern. Analysiert wurde die Pellikel mittels REM.

3.5.3 Bestimmung der Art und Einwirkzeit der Polyphenole

Nach der initialen Ätzung und der Erzeugung einer Pellikel *in-situ* wurden nun die Prüfkörper *ex-vivo* mit verschiedenen polyphenolhaltigen Lösungen über unterschiedliche Zeiträume gespült, um die geeignete Einwirkzeit sowie die geeignete polyphenolhaltige Substanz zu bestimmen.

Bei den eingesetzten Substanzen handelte es sich um die Polyphenole Tanninsäure, Gallotanninsäure, und Theranovis Gel (Theranovis KG, Bingen, Deutschland) sowie um das Phenol Thymol.

Die Tanninsäure wurde in Kapitel 2.3.1 bereits ausführlich beschrieben. In dieser Studie wurde sie in einer 1%igen Lösung benutzt. Bei der Gallotanninsäure handelt es sich um eine

Tanninsäure, die wie oben beschrieben zu den hydrolysierbaren Tanninen gezählt wird. Sie wurde im vorliegenden Versuch ebenso in einer 1%igen Lösung verwendet.

Inhaltsstoffe des Theranovis Gels sind unter anderem Öle aus Grapefruitsamen (Citrus Grandis seed oil), Thymian (thymus vulgaris oil), Pfefferminze (Mentha piperita oil), Rosmarin (Rosmarinus officinalis leaf oil) und aus Traubenkernen (Vitis vinifera seed oil). Bei all diesen Ölen handelt es sich um polyphenolhaltige Substanzen, die hier in einem Gel, zur Anwendung auf den Zähnen, zusammengefügt sind.

Thymol ist das wohl wichtigste monoterpenoide Phenol, welches im vorliegenden Versuch in einer 0,1%igen Lösung verwendet wurde.

Mit jeder der vier Substanzen wurden die Proben für 10 s, 30 s und 3 min *ex-vivo* gespült. Mit Tanninsäure zusätzlich auch noch weitere 10, 20 und 30 min. Zudem wurden Kontrollproben ohne Kontakt zu Polyphenolen hergestellt.

3.5.4 Festlegung der erneuten Einwirkdauer der Phosphorsäure

Der letzte Schritt des Versuchsaufbaus ist nun die erneute Behandlung mit Phosphorsäure. Hier wurden, analog zur Ätzdauer des ersten Schritts, 10 s ausgewählt. Dieser Versuch wurde neben der Tanninsäure auch mit Thymol durchgeführt, da sich im vorherigen Versuch mit diesen beiden Substanzen die erwünschten Ergebnisse zeigten. Nachdem der Prüfkörper primär mit Phosphorsäure geätzt wurde, wurde *in-vivo* eine 2 h Pellikel erzeugt und diese dann mit den beiden oben genannten Substanzen *ex-vivo* gespült. Nach dem kurzen Abspülen mit sterilem Wasser, wurden die Prüfkörper abschließend erneut 10 s mit der Säure behandelt. Auch Kontrollproben ohne abschließende Ätzung wurden erstellt, um das Ergebnis besser interpretieren zu können.

3.6 Hauptversuche

Die Ergebnisse der Vorversuche führten zu folgendem Versuchsaufbau für die Hauptversuche (Abb. 4).

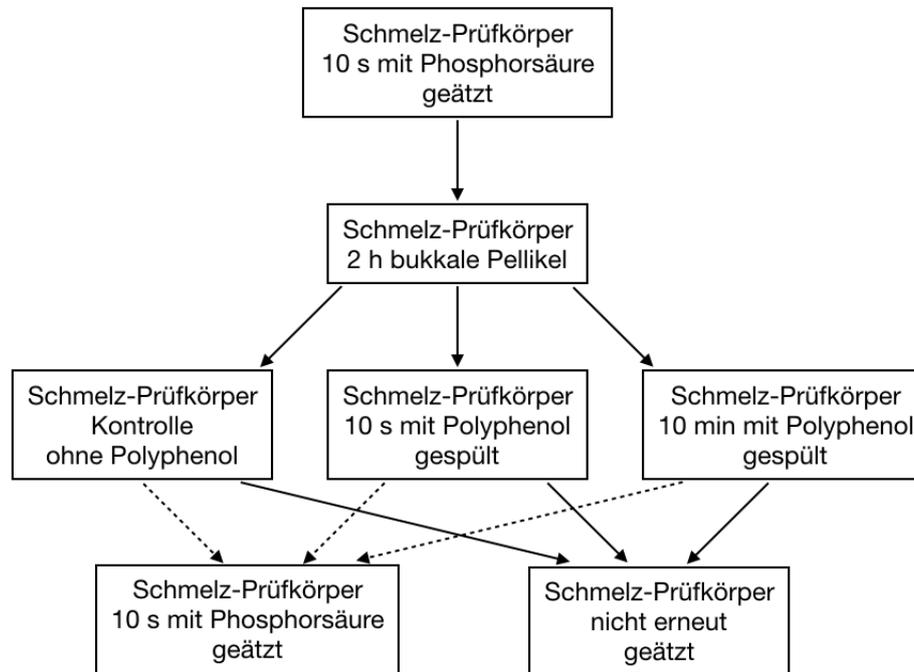


Abb. 4: Versuchsaufbau der Hauptversuche

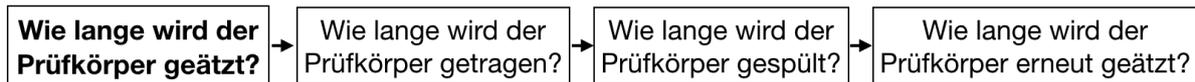
Die Hauptversuche wurden wie folgt durchgeführt. Zunächst wurden die Prüfkörper nach der Reinigung und Politur für 10 s mit Phosphorsäure geätzt, um die Erosion zu imitieren. Danach wurden sie auf den bukkalen Seiten der Zahnschienen aufgebracht, welche zur Erzeugung der Pellikel 2 h intraoral auf den Oberkieferzähnen getragen wurden. Die Schiene reichte vom Eckzahn bis zum zweiten Molar. Im nächsten Schritt schloss sich die Spülung der Prüfkörper *ex-vivo*, laut Versuchsschema für 10 s bzw. 10 min mit dem entsprechenden Polyphenol, an. Die Kontrollproben ohne Polyphenolspülung entstanden an dieser Stelle durch ausschließliches Abspülen der Prüfkörper mit sterilem Wasser, nach deren Entnahme aus den Schienen. Der letzte Schritt war die erneute Ätzung für 10 s mit Phosphorsäure. Dieser Schritt imitierte die wiederholte Säureeinwirkung, die z.B. durch den Genuss von Softdrinks oder Zitrusfrüchten auf den bereits erodierten Zahnschmelz wirkt. Zum Vergleich wurden hier, gemäß des Versuchsschemas, einige Proben nicht erneut angeätzt.

Bei den Polyphenolen, mit welchen dieser Versuch durchgeführt wurde, handelt es sich neben der Tanninsäure (1%) auch um Epigallocatechingallat (0,01%) und um ein experimentelles, wässriges Hopfenextrakt (NIC Nookandeh Institute GmbH, 66424 Homburg(Saar), Deutschland), die in Kapitel 2. ausführlich beschrieben wurden.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Vorversuche

Die verschiedenen Vorversuche sollten dazu dienen, die Parameter für die Hauptversuche festzulegen. Hierfür mussten verschiedene Fragen beantwortet werden.



Da in dieser Studie die Pellikel auf erodiertem Zahnschmelz, die subsurface Pellikel, untersucht werden sollte, diente der erste Vorversuch dazu, diese Erosion *ex-vivo* zu erzeugen. Hierfür wurden die zuvor polierten Schmelz-Prüfkörper mit Phosphorsäure (37%, Gel Etchant, Kerr Italia) behandelt. Die Prüfkörper wurden jeweils für 10, 30 und 60 s mit dem Gel beschickt, welches dann mit sterilem Wasser sorgfältig abgespült wurde. Die Ätzmuster wurden mit Hilfe des REM analysiert und verglichen. Nach 10 s sieht man bereits das charakteristische mikroretentive Ätzmuster mit der zerklüfteten Oberfläche (Abb. 5a).

Nach 30 s und 60 s wirkt das Ätzmuster etwas deutlicher ausgeprägt (Abb. 5b, c), jedoch ist dieser Unterschied nur marginal, sodass sich in diesem Versuch für eine Ätzdauer von 10 s entschieden wurde.

Ergebnisse

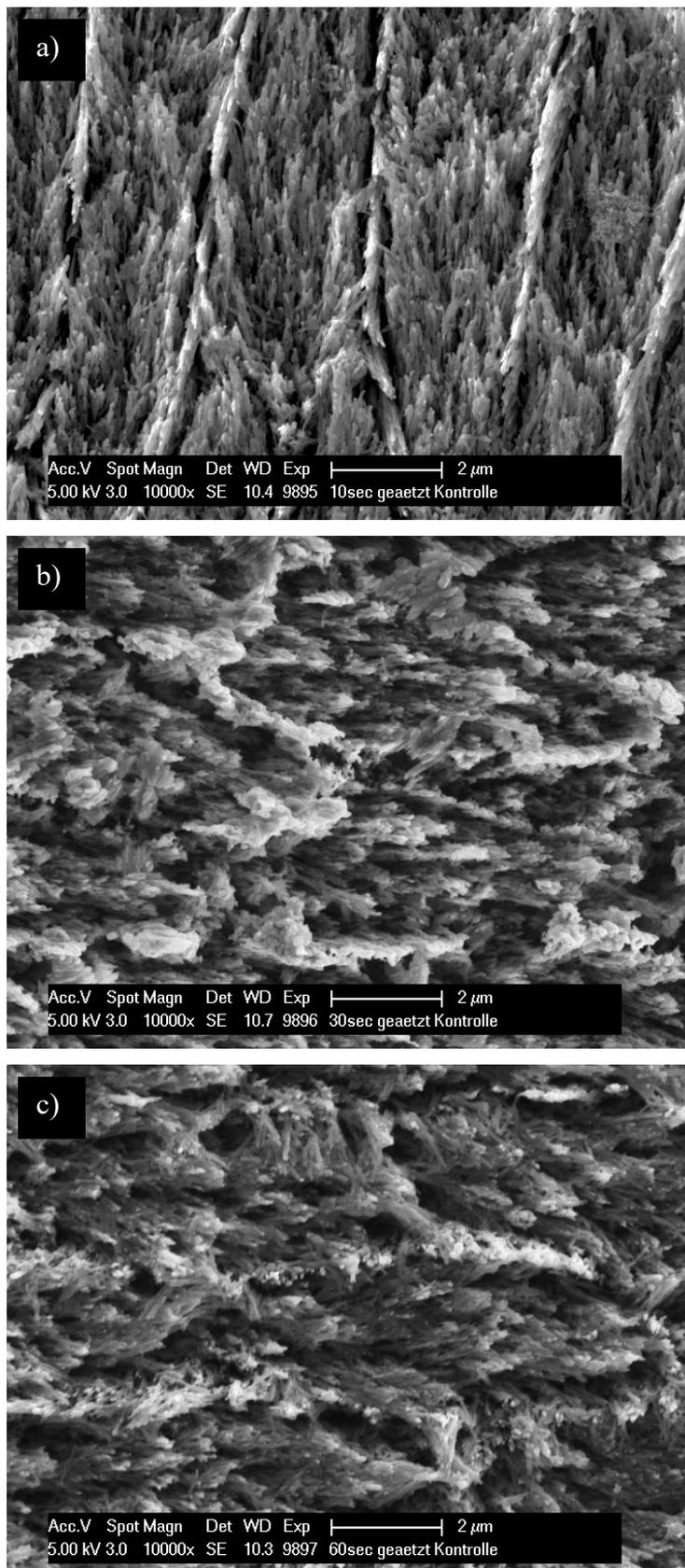
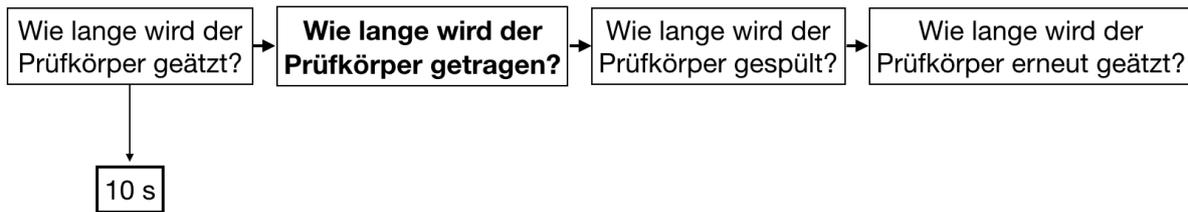


Abb. 5: REM-Analyse. a) 10 s b) 30 s c) 60 s Behandlung des Schmelz-Prüfkörpers mit Phosphorsäure. Das typische Ätzmuster ist gut erkennbar, der Unterschied zwischen 10 s und 60 s Ätzdauer ist sehr gering. Vergrößerung 10.000fach.

4.1.1 Ergebnisse der Vorversuche zur Pellikelschicht



Der nächste Vorversuch diente nun der Festlegung der Pellikelschicht, also der Beantwortung der Frage, wie lange die Schienen intraoral getragen werden sollen. Die Analyse erfolgte erneut mittels REM nach 30 min und nach 2 h intraoraler Tragedauer. Wie die Schienen und Prüfkörper hierfür vorbereitet wurden, ist in Kapitel 3. ausführlich beschrieben. Sowohl bei der 30 min (Abb. 6a), als auch bei der 2 h (Abb. 6b) Pellikel, erkennt man einen homogenen, granulären Belag, der die Oberfläche der Prüfkörper lückenlos bedeckt. Da verschiedene Studien bei zunehmender Reifung der Pellikel einen verbesserten Säureschutz zeigten, entschied man sich auch in diesem Versuch dafür mit einer 2 h Pellikel zu arbeiten.

Im nächsten Schritt ging es dann darum, eine subsurface Pellikel zu erzeugen und in diesem Zusammenhang sollte die festgelegte Einwirkdauer der Phosphorsäure von 10 s nochmals bestätigt werden. Die Prüfkörper wurden hierfür erneut 10, 30 bzw. 60 s angeätzt, bevor sie dann 2 h intraoral exponiert wurden.

Während man nach 10 und 30 s (Abb. 7a, b) Einwirkdauer der Säure das charakteristische Ätzmuster noch sehr gut erkennt, ist dies nach 60 s (Abb. 7c) nicht mehr der Fall. Auch hier erwies sich also die 10 s Einwirkdauer der Phosphorsäure im Zusammenhang mit der 2 h Tragedauer als geeignete Kombination, eine subsurface Pellikel zu erzeugen (Abb. 7a). In allen Fällen erkannte man, dass die Pellikel eine gleichmäßige Schicht über dem geätzten Schmelz gebildet hatte.

Ergebnisse

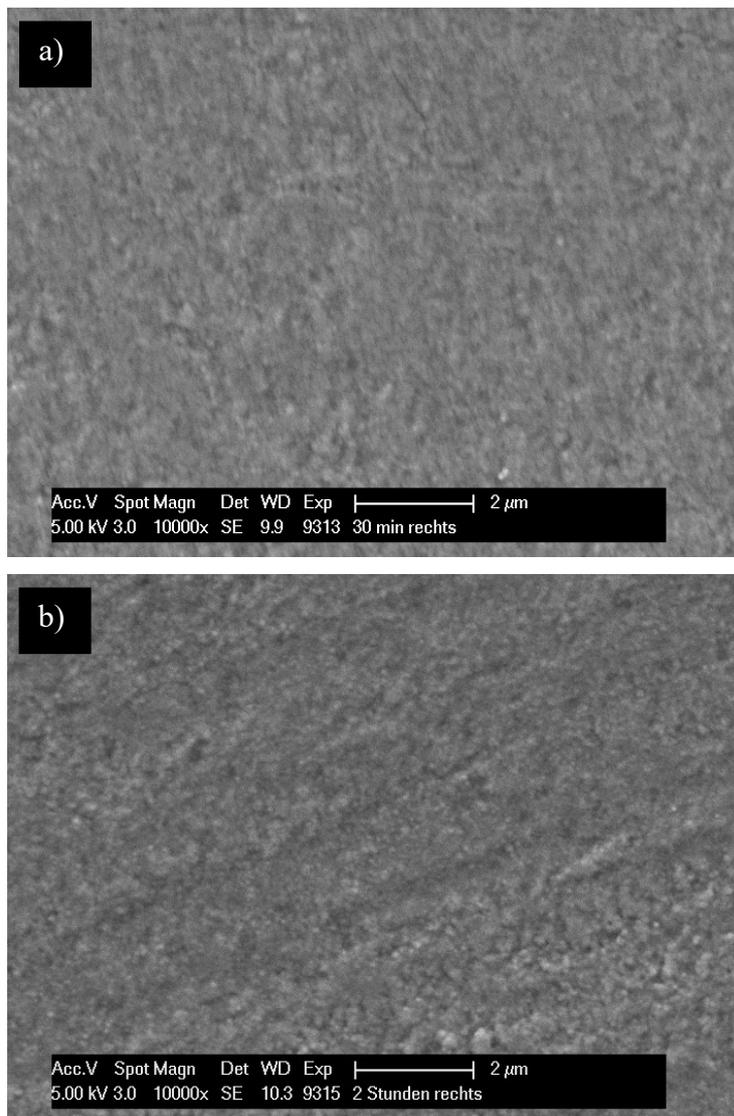


Abb. 6: REM-Analyse. a) **30 min** b) **2 h** bukkale Pellikelbildung auf einem polierten Zahnschmelz-Prüfkörper. Man erkennt einen homogenen, granulären Belag, der die Zahnoberfläche lückenlos bedeckt. Unterschiede zwischen der 30 min und der 2 h Pellikel sind hier nur marginal erkennbar. Vergrößerung 10.000fach.

Ergebnisse

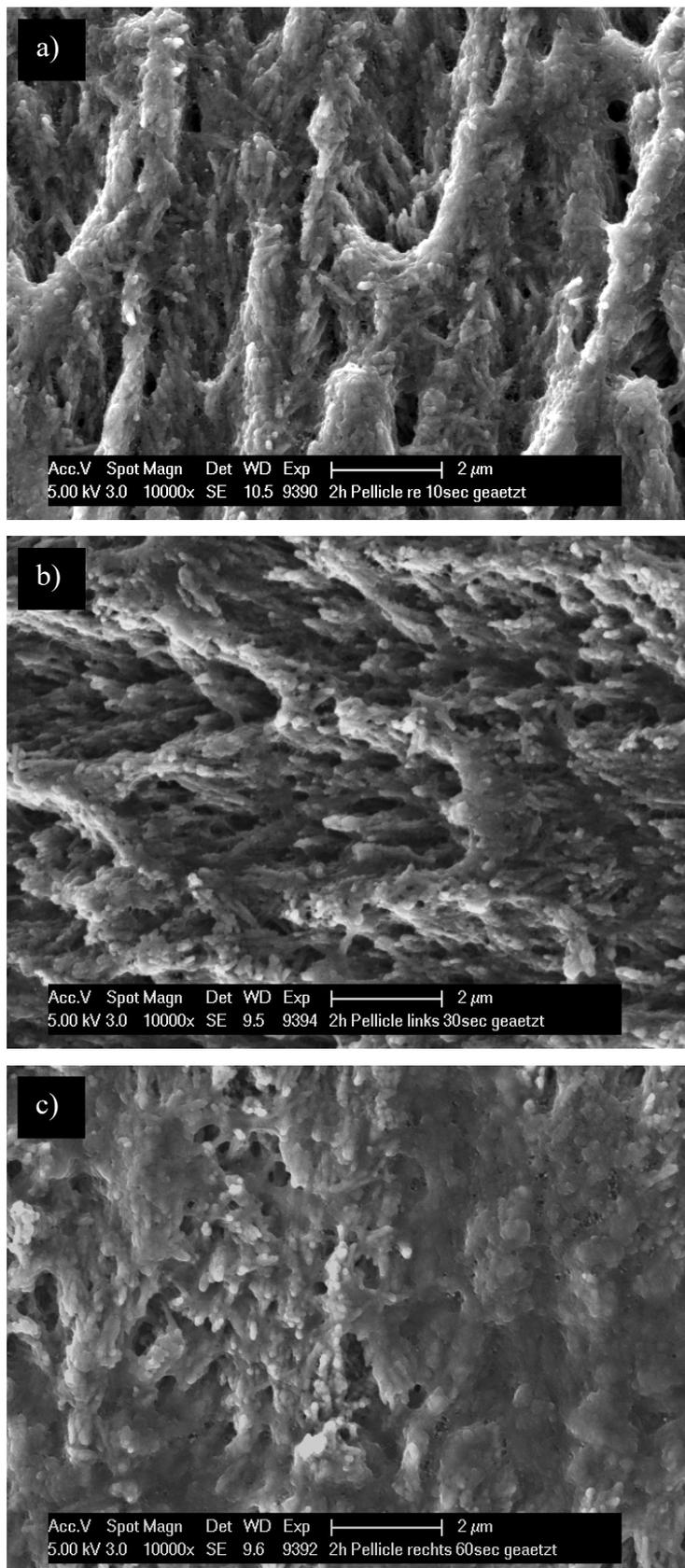
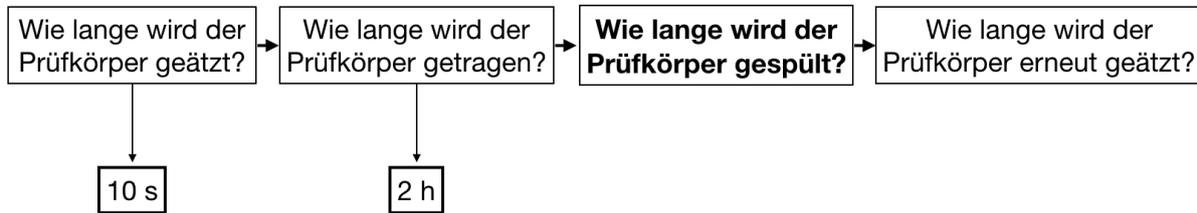


Abb. 7: REM-Analyse. Nach a) 10 s b) 30 s c) 60 s Behandlung mit Phosphorsäure (37%) wurde der Schmelz-Prüfkörper zur Pellicelbildung 2 h intraoral, bukkal getragen. Die Pellicel hat sich in einer gleichmäßigen Schicht über die Schmelzprismen gelegt. Während man das charakteristische Ätzmuster nach 10 s und 30 s Ätzung noch gut erkennt, ist dies nach 60 s nicht mehr der Fall. Vergrößerung 10.000fach.

4.1.2 Ergebnisse der Vorversuche zur Art und Einwirkzeit der Polyphenole

Der nächste Schritt galt der Festlegung der Art des Polyphenols sowie dessen geeigneter Einwirkdauer.



Bei den eingesetzten Substanzen handelte es sich um die Polyphenole Tanninsäure, Gallotanninsäure, und Theranovis Gel (Theranovis KG, Bingen, Deutschland) sowie um das Phenol Thymol.

Mit jeder der vier Substanzen wurden die Proben für jeweils 10 s, 30 s und 3 min *ex-vivo* gespült. Mit Tanninsäure zusätzlich auch noch weitere 10, 20 und 30 min. Man erwartete, dass sich die Pellikel dadurch soweit modifizieren lässt, dass sie sich deutlich verdickt und verdichtet zeigen wird. Des Weiteren wurde zur Kontrolle auch immer eine Probe ohne Polyphenolspülung hergestellt (Abb. 7a). Die Analyse erfolgte wieder mittels REM.

Vor allem bei der Modifikation mit Tanninsäure (Abb. 8, 9) und Thymol (Abb. 11) sieht man eine deutlich verdickte und elektronendichtere subsurface Pellikel, verglichen mit der Kontrolle. Thymol schied jedoch aufgrund seiner Zytotoxizität für die weiteren Versuche aus. Die Gallotanninsäure lieferte weniger überzeugende Ergebnisse (Abb. 10). Die Pellikel wirkt hier auch verdichtet, jedoch nicht so stark wie nach der Behandlung mit Tanninsäure. Nach der Spülung mit Theranovis Gel sieht man deutliche Verklebungen der Schmelzoberfläche (Abb. 12), welche darauf zurückzuführen sind, dass sich das Gel nach der entsprechenden Einwirkdauer nur schwer von den Prüfkörpern entfernen ließ. Für den hier geplanten Versuch erschien diese Substanz somit unbrauchbar.

In Bezug auf die Dauer der Spülung zeigten sich bei allen Substanzen bereits nach 10 s (Abb. 8a, 10a, 11a, 12a) erste Effekte gegenüber der Kontrolle ohne Polyphenolspülung. Bei der Tanninsäure waren die Veränderungen nach 10 min (Abb. 9a) noch deutlicher zu beobachten. Diese ließen sich jedoch nach 20 und 30 min nicht wesentlich verstärken (Abb. 9b, c). Aus diesen Gründen wurden sowohl 10 s, als auch 10 min als Spüldauer für die weiteren Versuche festgelegt.

Tanninsäure

Der Prüfkörper wurde 10 s geätzt, zur Pellikelbildung 2h intraoral, bukkal exponiert und anschließend *ex-vivo* mit 1% Tanninsäure behandelt (Abb. 8, 9). Bereits nach 10 s Spülung (Abb. 8a) erkennt man deutlich, wie sich die modifizierte Pellikel zwischen den Schmelzprismen eingelagert hat und die Oberfläche regelrecht zu verkleben scheint. Sie wirkt ebener als in der Kontrolle ohne Spülung (Abb. 7a). Die Pellikel erscheint zudem dichter und das Ätzmuster ist noch leicht erkennbar. Mit zunehmender Spüldauer bis hin zu 10 min (Abb. 9a) erscheint die subsurface Pellikel stetig mehr verdickt und verdichtet. Nach 20 und 30 min Spülung (Abb. 9b,c) ist jetzt kein Unterschied zu 10 min mehr auszumachen. Das Ätzmuster ist bis zur 30 s (Abb. 8b) Spülung noch gut zu erkennen und ab 3 min (Abb. 8c) nur noch zu erahnen.

Ergebnisse

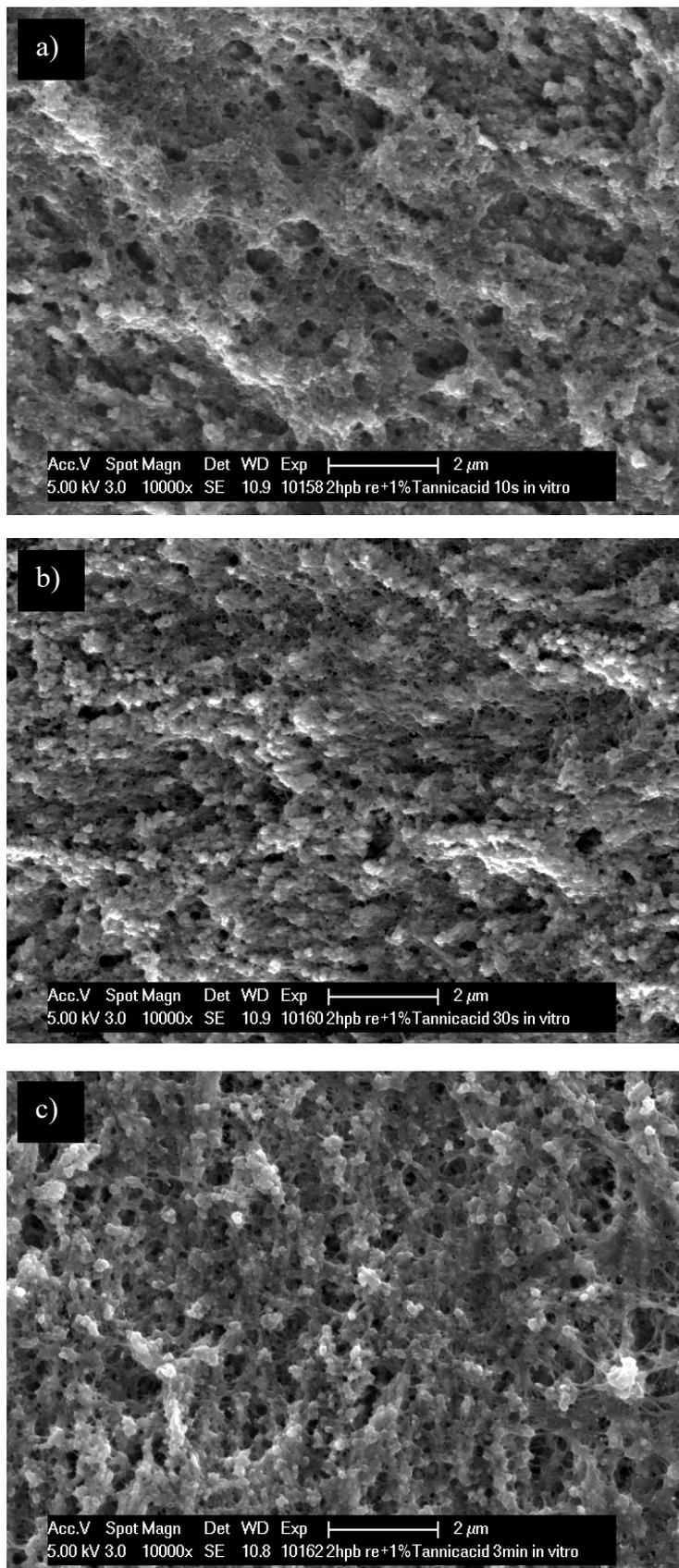


Abb. 8: REM-Analyse. Der Prüfkörper wurde 10 s geätzt, zur Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert und anschließend a) 10 s b) 30 s c) 3 min *ex-vivo* mit 1% **Tanninsäure** behandelt. Verglichen mit den 10 und 30 s Spülungen scheint die Oberfläche nach 3 min Behandlung ausgeprägter verklebt zu sein. Die Pellikel erscheint zudem weiter verdichtet und das Ätzmuster ist nach 3 min nur noch zu erahnen. Vergrößerung 10.000fach.

Ergebnisse

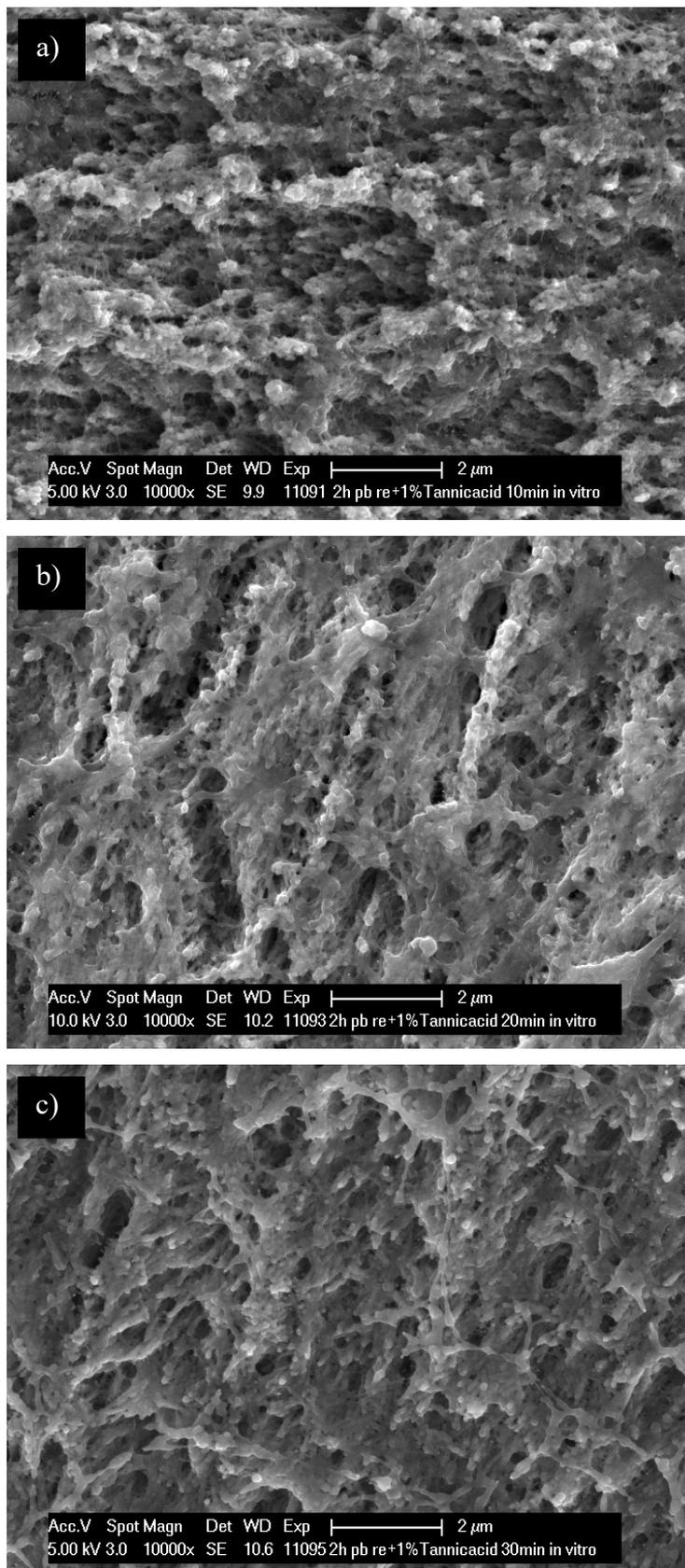


Abb. 9: REM-Analyse. Der Prüfkörper wurde 10 s geätzt, zur Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert und anschließend a) **10 min** b) **20 min** c) **30 min** *ex-vivo* mit 1% **Tanninsäure** behandelt. Die Pellikel erscheint verglichen mit der 10 min Spülung nicht weiter verdickt. Das Ätzmuster ist weiterhin zu erahnen. Vergrößerung 10.000fach.

Gallotanninsäure

Der Prüfkörper wurde 10 s geätzt, zur Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert und anschließend *ex-vivo* mit 1% Gallotanninsäure behandelt (Abb. 10). Man erkennt auch hier wieder gut, wie sich die modifizierte Pellikel zwischen den Schmelzprismen eingelagert hat, und die Oberfläche scheint bereits nach 10 s (Abb. 10a) ebener als bei der Kontrolle ohne Spülung (Abb. 7a). Die Pellikel wirkt verdickt und das Ätzmuster ist noch zu erkennen. Verglichen mit 10 s-Spülung wirkt die subsurface Pellikel nach 3 min (Abb. 10c) weiter verdickt und verdichtet.

Ergebnisse

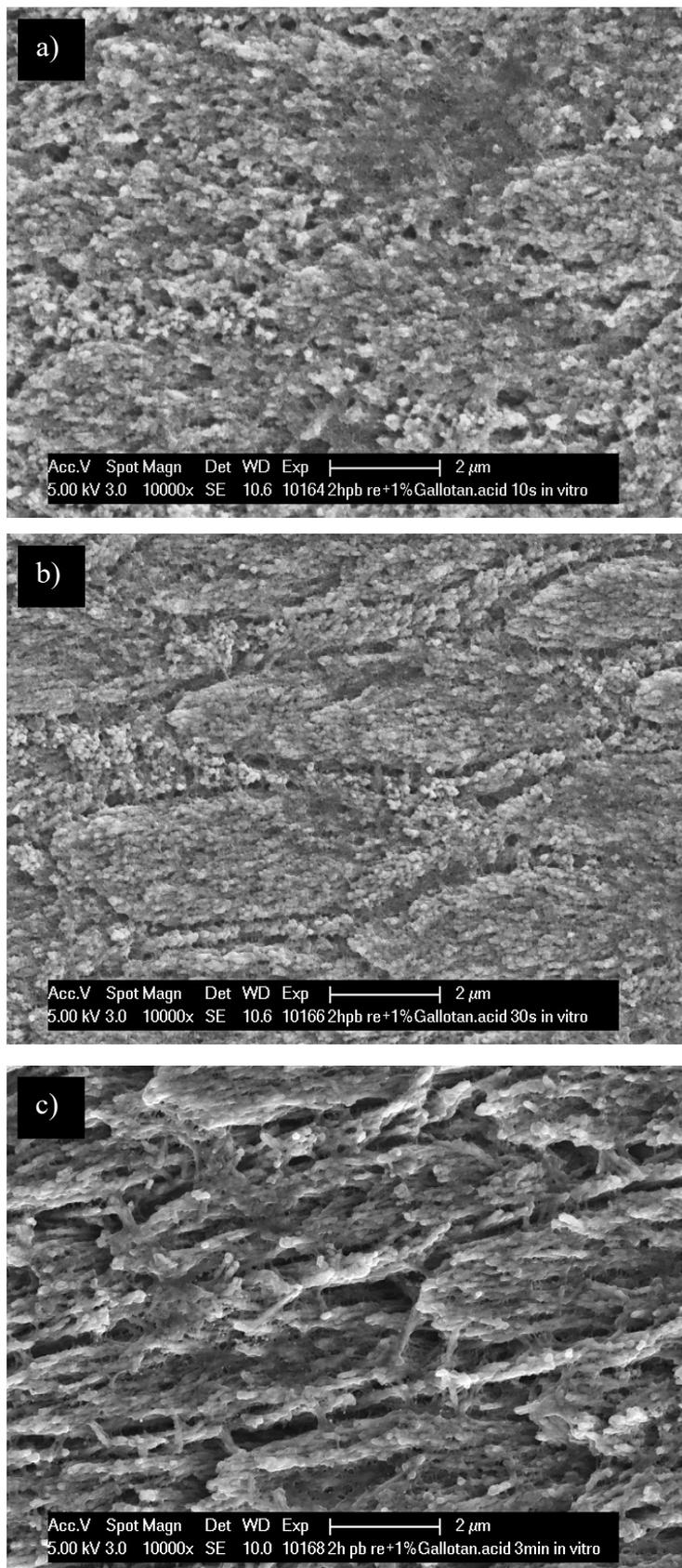


Abb. 10: REM-Analyse. Der Prüfkörper wurde 10 s geätzt, zur Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert und anschließend a) **10 s** b) **30 s** c) **3 min** *ex-vivo* mit 1% **Gallotanninsäure** behandelt. Die Verklebungen sind nach 3 min im Unterschied zur 10 s Spülung deutlicher erkennbar. Die Pellikel erscheint verdickt und das Ätzmuster ist noch erkennbar. Vergrößerung 10.000fach.

Thymol

Der Prüfkörper wurde 10 s geätzt, zur Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert und anschließend *ex-vivo* mit 0,1% Thymol behandelt (Abb. 11). Man erkennt gut, wie sich die modifizierte Pellikel zwischen den Schmelzprismen eingelagert hat, und die Oberfläche scheint ebener als bei der Kontrolle ohne Spülung. Die Pellikel wirkt auch hier verdickt, und das Ätzmuster ist noch zu erkennen. Das Ergebnis ist vergleichbar mit dem der Tanninsäure. Mit zunehmender Dauer der Thymolexposition wirkt die subsurface Pellikel verdickter und die Oberfläche erscheint weiter verklebt.

Ergebnisse

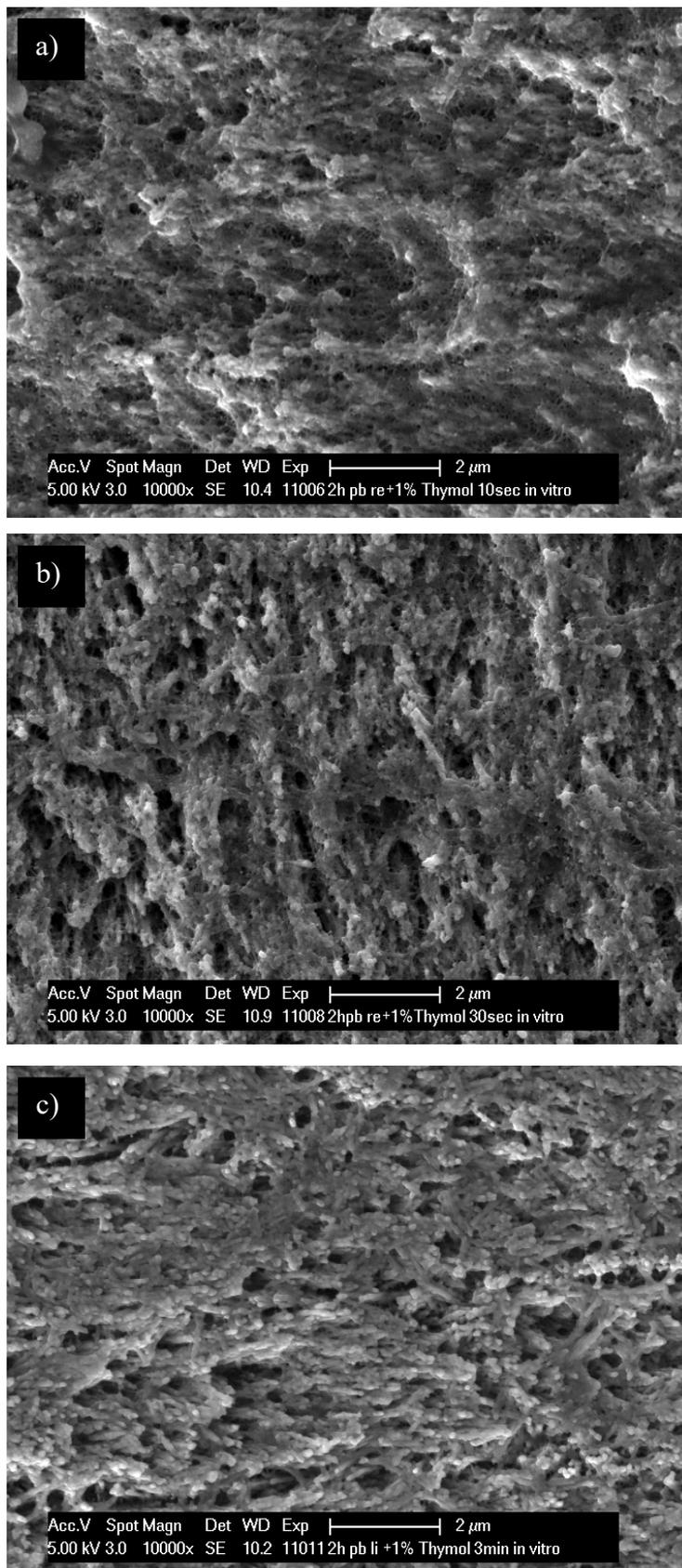


Abb. 11: REM-Analyse. Der Prüfkörper wurde 10 s geätzt, zur Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert und anschließend a) 10 s b) 30 s c) 3 min *ex-vivo* mit 0,1% **Thymol** behandelt. Die Pellikel wirkt auch hier mit zunehmender Expositionsdauer des Thymols weiter verdickt und das Ätzmuster ist nach 3 min nur noch zu erkennen. Vergrößerung 10.000fach.

Theranovis Gel

Der Prüfkörper wurde 10 s geätzt, zur Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert und anschließend *ex-vivo* mit Theranovis Gel behandelt (Abb. 12). Man erkennt, wie sich das Gel zwischen den Schmelzprismen eingelagert hat. Die Oberfläche scheint stark. Die Pellikel wirkt verdickt und das Ätzmuster ist noch zu erkennen. Besonders nach 30 s (Abb. 12b) ist die Struktur des Gels noch erkennbar. Das Ätzmuster ist hier nur noch zu erahnen.

Ergebnisse

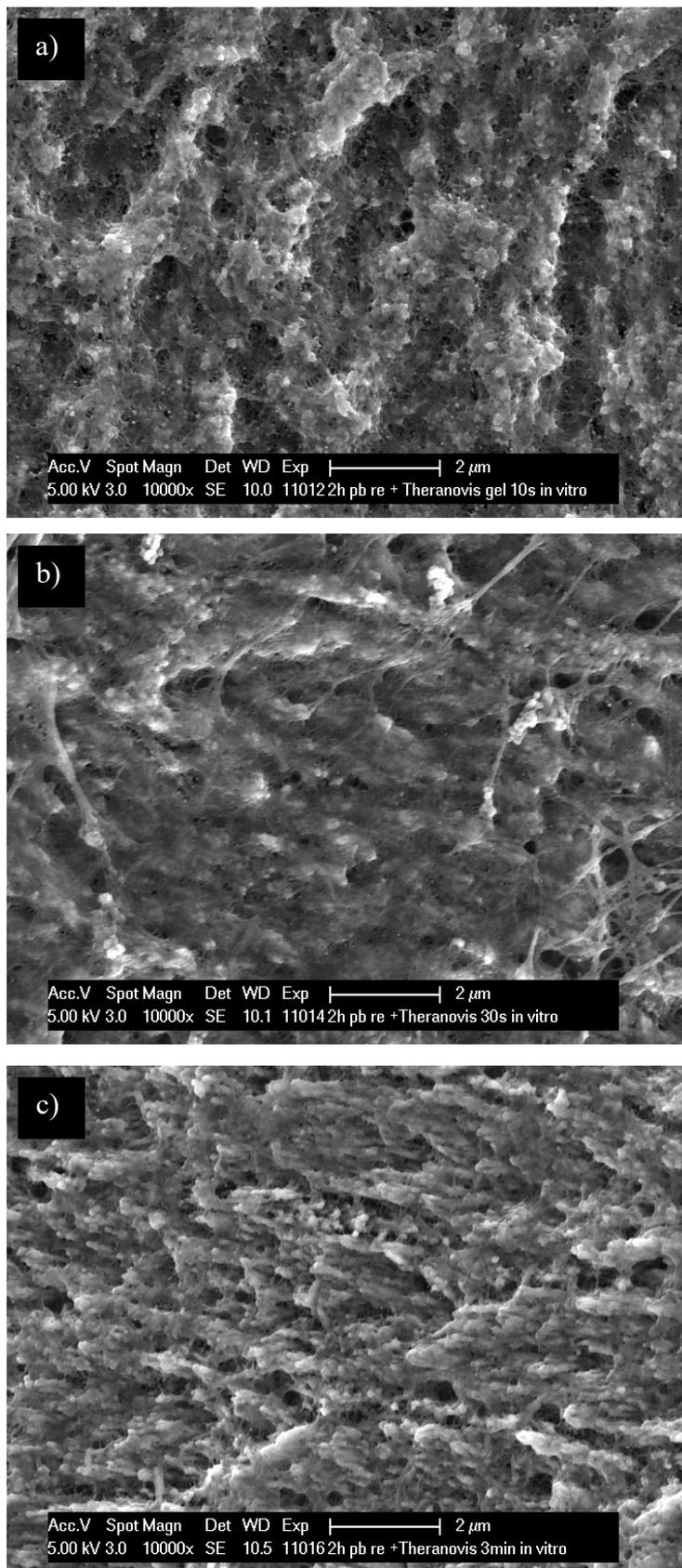
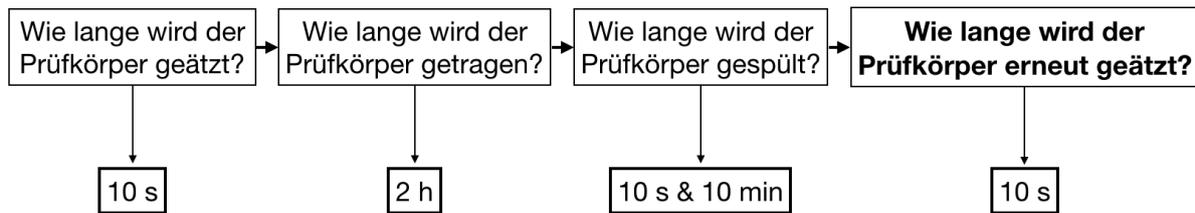


Abb. 12: REM-Analyse. Der Prüfkörper wurde 10 s geätzt, zur Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert und anschließend a) 10 s b) 30 s c) 3 min *ex-vivo* mit **Theranovis Gel** behandelt. Die Oberfläche erscheint hier stark verklebt und das Ätzmuster ist teilweise kaum noch erkennbar. Vergrößerung 10.000fach.

4.1.3 Ergebnisse der Vorversuche zur erneuten Einwirkdauer der Phosphorsäure



Die letzte offene Frage war nun die Dauer der erneuten Einwirkung der Phosphorsäure, nachdem die Pellikel für 10 s bzw. 10 min mit dem Polyphenol behandelt wurde. Auf Grund der erwartungsgemäßen Ergebnisse mit Tanninsäure und Thymol aus dem vorherigen Versuch, wurde nun mit diesen beiden Substanzen weitergearbeitet. Analog zur Ätzdauer des ersten Vorversuchs wurde auch hier eine Einwirkzeit der Phosphorsäure von 10 s ausgewählt. Mit beiden Substanzen zeigen sich bei der Analyse mittels REM wünschenswerte Ergebnisse. Die Oberfläche der Kontrollprobe, bei der die nicht modifizierte Pellikel auf erodiertem Zahnschmelz erneut mit der Säure behandelt wurde, erschien stark zerklüftet, und das Ätzmuster noch gut erkennbar. Im Gegensatz dazu wirkte die Oberfläche sowohl bei Tanninsäure (Abb. 15), als auch bei Thymol (Abb. 14), weniger zerklüftet und ebenmäßiger. Man erkannte das Ätzmuster noch, aber die durch die Polyphenole verdickte Pellikel überzog die Oberfläche und schien sie zu verkleben. Dieser Effekt zeigte sich insbesondere bei der 10 min Spülung mit Tanninsäure (Abb. 15b).

Ergebnisse

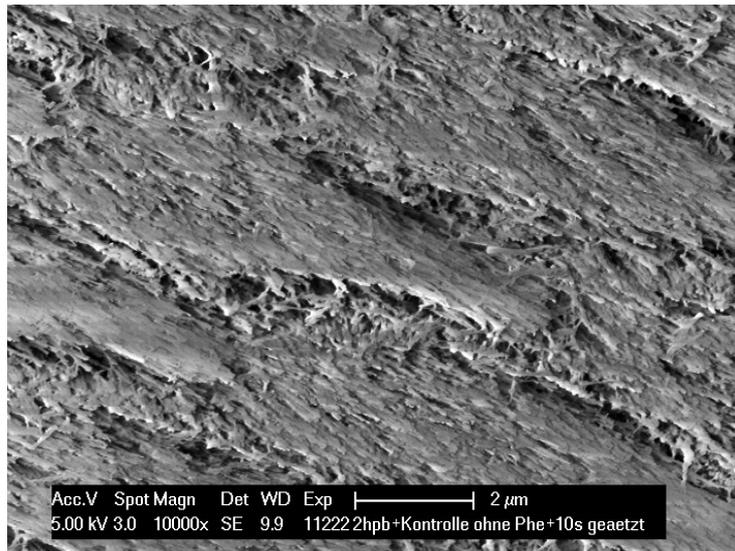


Abb. 13: REM-Analyse. **Kontrolle**. Der Prüfkörper wurde 10 s geätzt, zur Pellicelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert, nicht mit Polyphenolen behandelt und anschließend erneut 10 s geätzt. Man erkennt das Ätzmuster noch, aber die Oberfläche erscheint nicht so zerklüftet, wie das ohne Pellicel der Fall war. Vergrößerung 10.000fach.

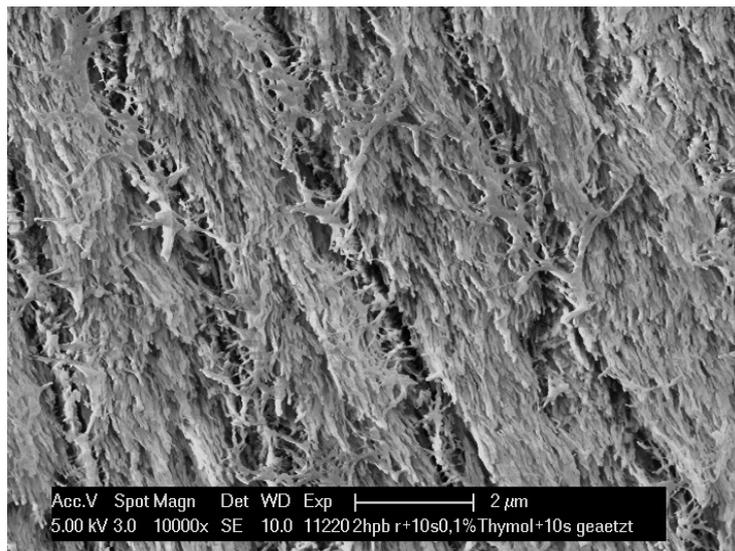


Abb. 14: REM-Analyse. Der Prüfkörper wurde 10 s geätzt, zur Pellicelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert, **10 s ex-vivo** mit 0,1% **Thymol** behandelt und anschließend erneut 10 s geätzt. Die Oberfläche erscheint verklebt und wenig zerklüftet und ähnelt dem Bild mit der Tanninsäurespülung. Das Ätzmuster ist auch hier erkennbar und es sind deutliche Unterschiede zur Kontrolle zu beobachten. Vergrößerung 10.000fach.

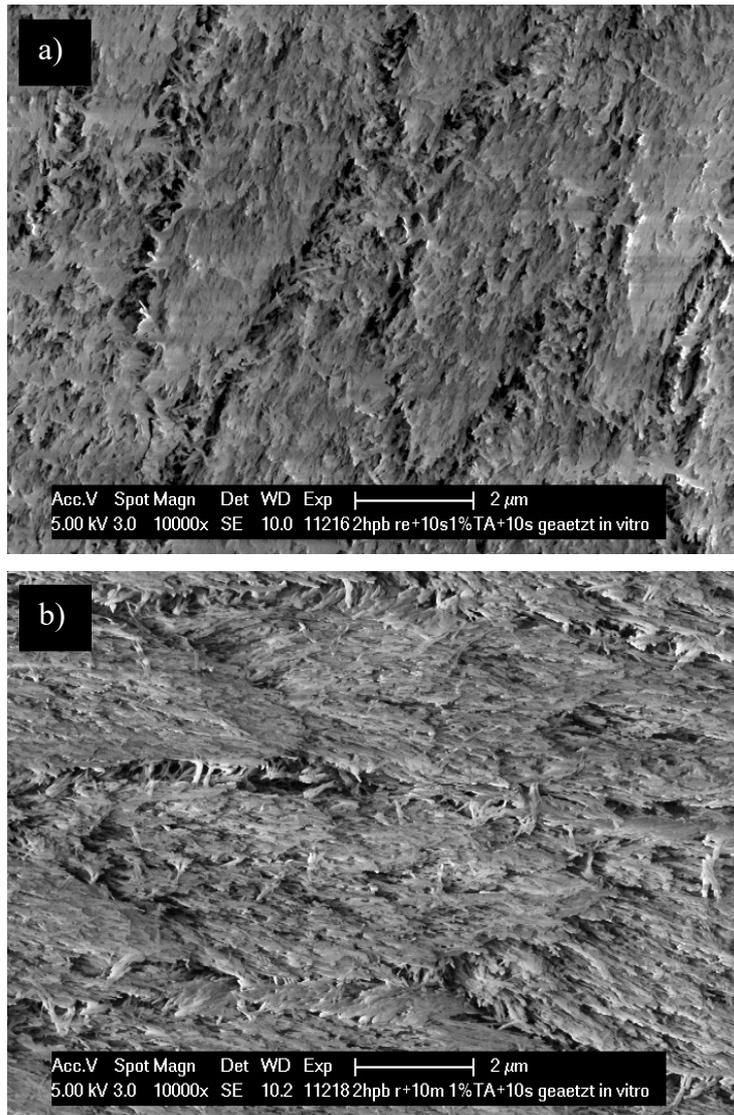


Abb. 15: REM-Analyse. Der Prüfkörper wurde 10 s geätzt, zur Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert, a) **10 s** b) **10 min** *ex-vivo* mit 1% **Tanninsäure** behandelt und anschließend erneut 10 s geätzt. Verglichen mit der 10 s Tanninsäureexposition und der Kontrolle, erscheint die Oberfläche nach 10 min deutlich weniger stark zerklüftet und regelrecht verklebt. Das Ätzmuster ist auch hier weiterhin erkennbar, jedoch nicht mehr so eindeutig. Verglichen mit der Kontrolle sind nach 10 min deutliche Unterschiede erkennbar. Vergrößerung 10.000fach.

4.2 Ergebnisse der Hauptversuche

Nachdem nun mit Hilfe der Vorversuche alle Fragen beantwortet wurden, konnten die Hauptversuche nach dem oben bereits beschriebenen Versuchsschema (Abb. 4) durchgeführt werden. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt. Zu Beginn werden die Proben beschrieben, die auf polierten Zahnschmelz-Prüfkörpern erzeugt wurden, bevor die Ergebnisdarstellung der Versuche mit der subsurface Pellikel erfolgt. Zuletzt wird dann dargestellt, wie sich die Pellikel verändert, wenn diese erneut angeätzt wird. Es wird bei den Versuchen immer auch eine Kontrolle dargestellt, bei der die native Pellikel behandelt wurde.

Im Rasterelektronenmikroskop (REM) konnte man in den Vorversuchen eine erhöhte Dichte der Pellikel nach der Behandlung mit Polyphenolen beobachten, jedoch konnte die Dicke der Pellikelschicht nicht beurteilt werden. Auch nach der Aufarbeitung der Proben als Blockface-Präparat war die Leistung des Mikroskops nicht ausreichend, also erfolgte in den Hauptversuchen die Analyse mittels Transmissionselektronenmikroskop (TEM).

Die erste Versuchsreihe zeigt die 2 h Pellikel für jeweils 10 s bzw. 10 min mit der 1%igen Tanninsäure gespült. Die Prüfkörper selbst wurden hier bis 4.000 Grit poliert und nicht mit Phosphorsäure behandelt. Eine Kontrollprobe mit der unbehandelten Pellikel wurde auch hergestellt. Je nach Versuchsschema wurden einige Proben jetzt noch 10 s mit Phosphorsäure angeätzt.

Zunächst werden nun die Proben ohne abschließende Ätzung besprochen.

Bei der Kontrollprobe war die nicht modifizierte Pellikel als dünne Auflagerung auf dem polierten Schmelz zu erkennen (Abb. 16). Die modifizierte Pellikel hingegen erschien bereits nach 10 s deutlich verstärkt (Abb. 18a). Die kompakte, basale Schicht war erkennbar, welcher über weite Strecken eine breite äußere Schicht aufgelagert war. Nach 10 min zeigte sich diese zuvor eher locker erscheinende Auflagerung deutlich verstärkt und kompakter (Abb. 18b). Es konnten nur wenige Stellen gefunden werden, an denen diese verbreiterte Pellikel nicht auszumachen war.

Bei den REM-Bildern der Blockface-Präparate war die Pellikel nicht gut erkennbar (Abb. 17). Für eine Analyse war die Bildqualität nicht ausreichend.

Bei den Proben, welche abschließend 10 s mit Phosphorsäure behandelt wurden, konnte man auf dem Bild der Kontrolle nur noch geringe Reste einer Pellikel ausmachen. Sie wurde durch

Ergebnisse

die Phosphorsäure fast vollständig entfernt (Abb. 19). Dies änderte sich auch nach der Spülung der Proben für 10 s nicht.

Auf den REM-Bildern der Blockface-Präparate war die Pellikel nicht zu beurteilen, allerdings erkannte man hier sehr gut das Ätzmuster in der oberflächlichen Schmelzschicht (Abb. 20).

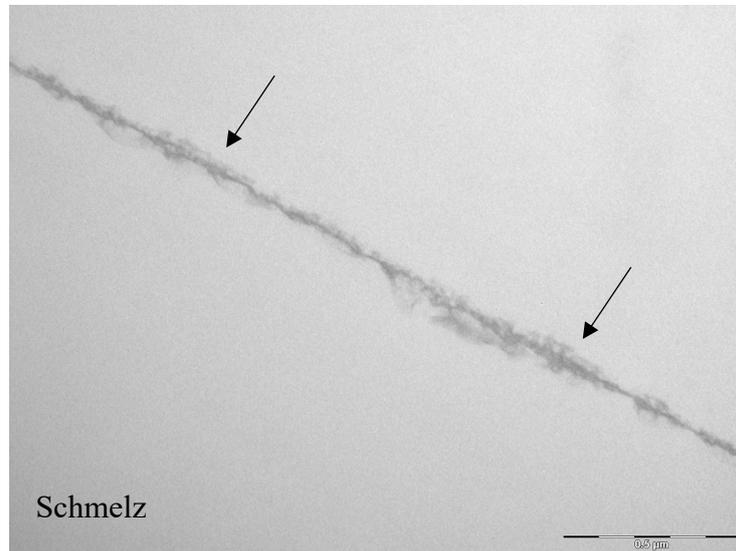


Abb. 16: TEM-Analyse. **Kontrolle.** Der Schmelz-Prüfkörper ist primär ungeätzt und zur Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert. Es imponiert eine dünne, unbehandelte Pellikelschicht (Pfeile). Vergrößerung 49000x.

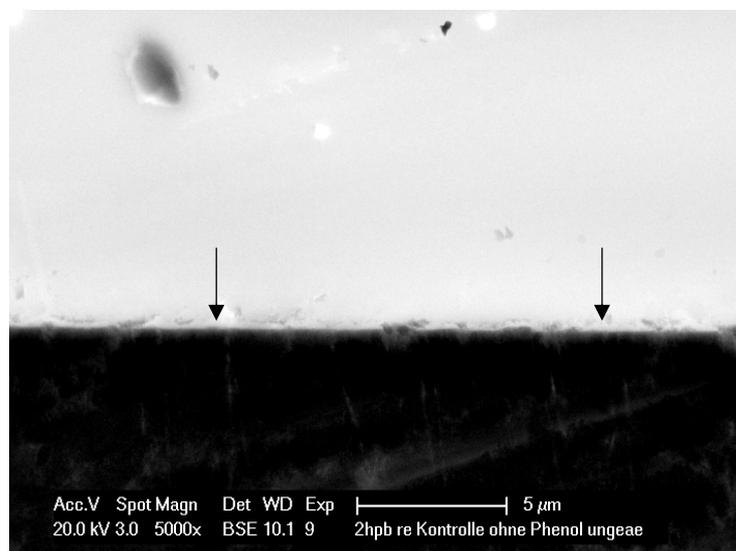


Abb. 17: REM-Analyse. **Kontrolle.** Der Schmelz-Prüfkörper ist primär ungeätzt und zur Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert. Man kann die dünne, unbehandelte Pellikelschicht (Pfeile), die dem Schmelz (dunkel) aufgelagert ist, nicht sehr gut erkennen und analysieren. Blockface-Präparat. Vergrößerung 5000x.

Ergebnisse

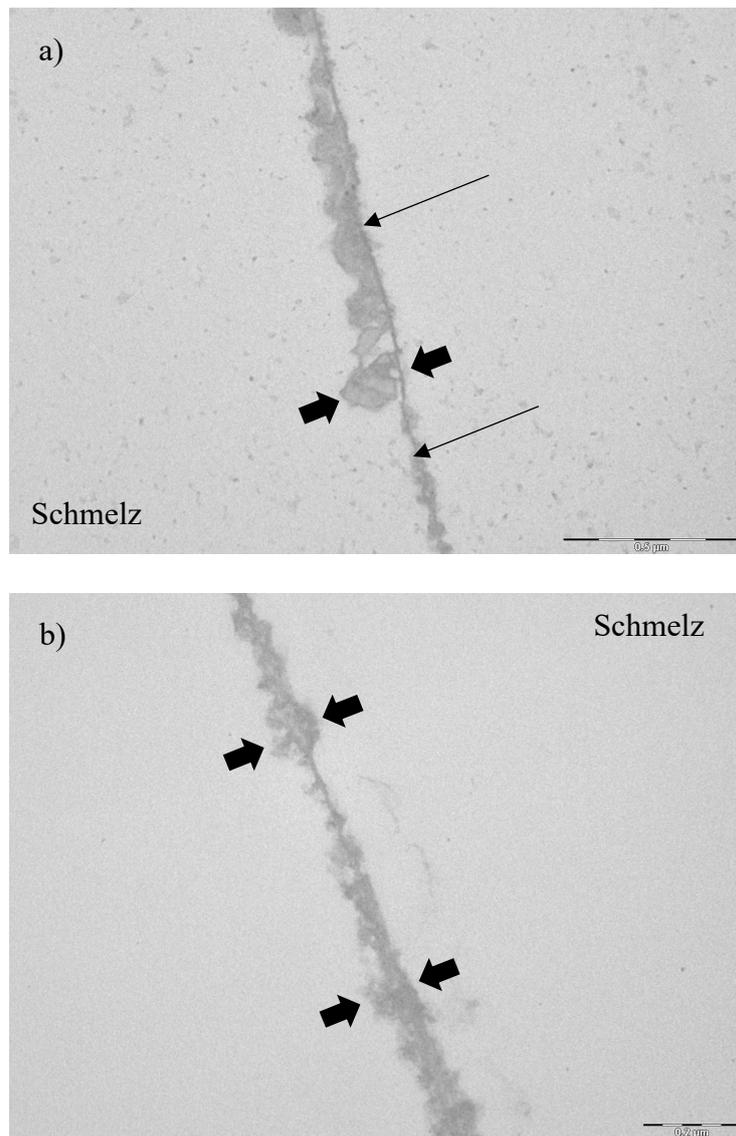


Abb. 18: TEM-Analyse. Der Schmelz-Prüfkörper ist primär ungeätzt und zur Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert. Die Pellikel wurde jetzt a) **10 s** b) **10 min** mit 1% **Tanninsäure** behandelt. Man erkennt, dass die modifizierte Pellikelschicht deutlich dicker ist (dicke Pfeile), als in der Kontrolle. Des Weiteren ist eine elektronendichte basale Schicht erkennbar (dünne Pfeile). Nach 10 min wirkt die Pellikel dichter und kompakter als nach der 10 s Tanninsäure-Spülung. Vergrößerung a) 49000x b) 68000x.

Ergebnisse

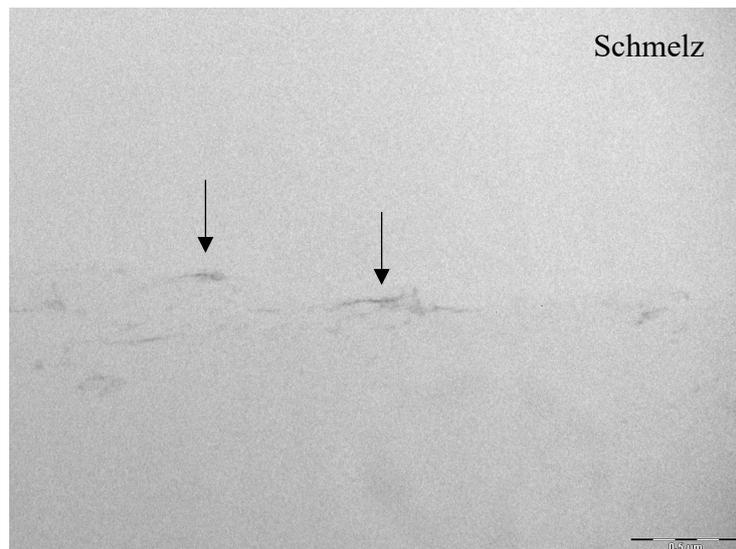


Abb. 19: TEM- Analyse. **Kontrolle.** Der Schmelz-Prüfkörper ist primär ungeätzt, zur Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert und dann ohne vorherige Spülung mit einem Polyphenol 10 s mit Phosphorsäure behandelt. Im Unterschied zum vorherigen Kontroll-Versuch erkennt man die Pellikel (Pfeil) nur noch in Ansätzen. Vergrößerung 30000x.

Ergebnisse

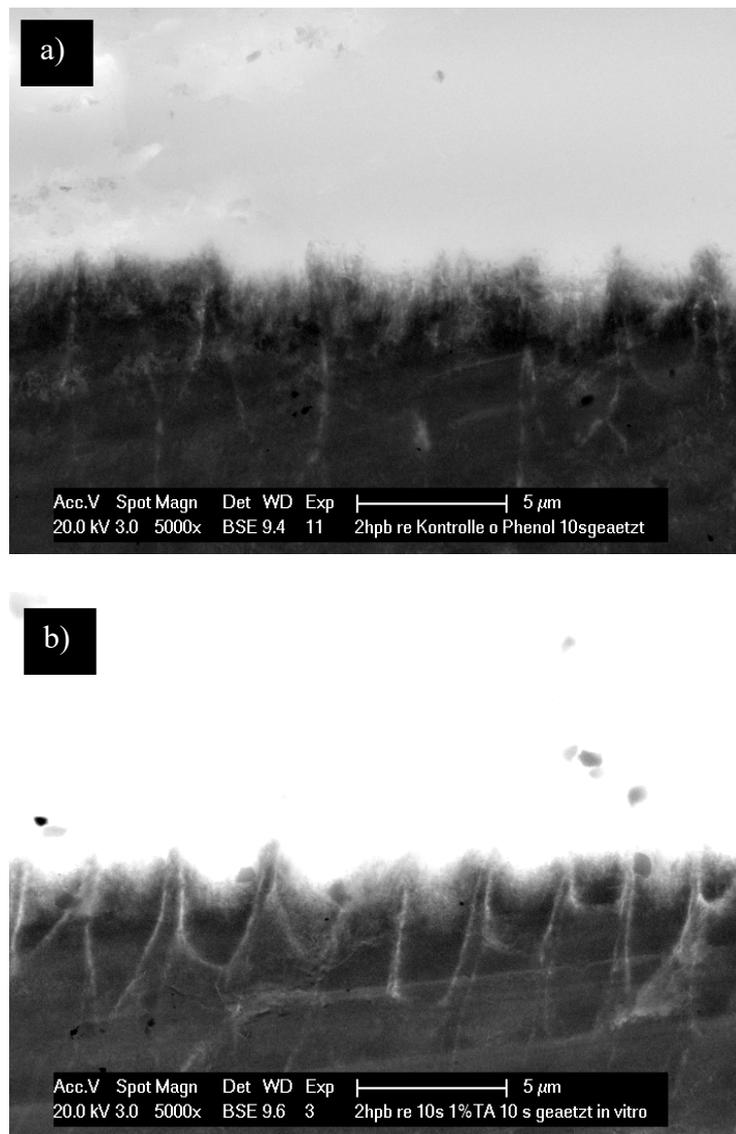


Abb. 20: REM-Analyse. Blockface-Präparate. Der Schmelz-Prüfkörper ist primär ungeätzt und zur Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert. Im Anschluss daran wurde er a) **nicht (Kontrolle)** b) **10 s** mit 1% **Tanninsäure** und 10 s mit Phosphorsäure behandelt. Man kann die modifizierte Pellikelschicht, die dem Schmelz (dunkel) aufgelagert ist, nicht sehr gut erkennen und analysieren. Man erkennt jedoch sehr gut das Ätzmuster im Schmelz. Vergrößerung 5000x.

Die zweite Versuchsreihe bezieht sich jetzt auf primär 10 s mit 37% Phosphorsäure behandelte Schmelz-Prüfkörper. Hier wurde die subsurface Pellikel entweder mit 1% Tanninsäure, 0,01% EGCG oder mit dem experimentellen Hopfenextrakt behandelt. Zum Vergleich gab es immer auch Kontrollen ohne die Behandlung mit dem entsprechenden Polyphenol.

Zunächst zu den Proben, welche nach der Polyphenolbehandlung nicht mehr angeätzt wurden. Bei der Kontrollprobe, welche die unbehandelte Pellikel auf angeätztem Zahnschmelz darstellt, erkannte man eine eher lockere Anordnung der organischen Bestandteile mit relativ großen, freien Zwischenräumen. Man sah gut, wie tief die Pellikel den Schmelz infiltriert. Diese

Ergebnisse

subsurface Pellikel schien die Unebenheiten, die durch die Erosion zustande kamen, regelrecht auszufüllen. Das wurde vor allem im Vergleich mit der Kontrollprobe der vorherigen Versuchsreihe auf poliertem Zahnschmelz deutlich (Abb. 16).

Auf allen Bildern der Proben mit modifizierter subsurface Pellikel war sehr gut erkennbar, dass diese nach der Behandlung mit Polyphenolen deutlich elektronendichter und auch dicker erschien. Die freien Zwischenräume erschienen verkleinert, und die Pellikel wirkte kompakter. Dies war nach der 10 min Polyphenolspülung noch besser zu beobachten, als nach der für 10 s.

Ergebnisse

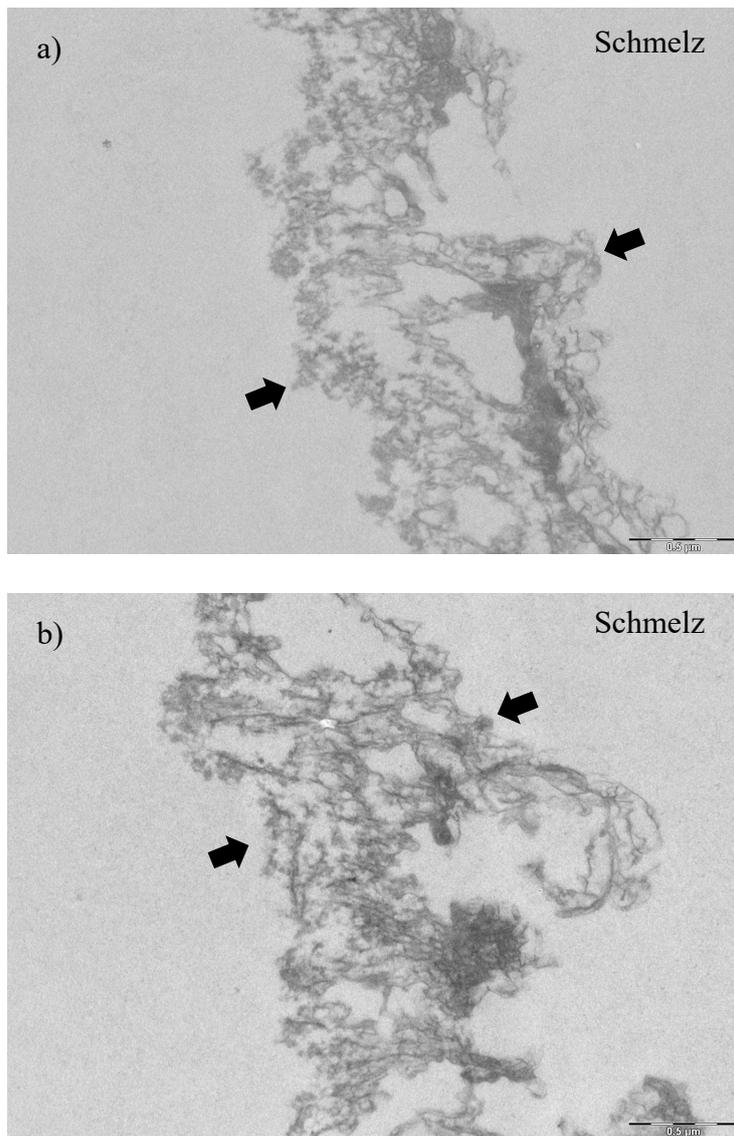


Abb. 21: TEM-Analyse. **Kontrolle** – Darstellung der **subsurface Pellikel**. Der Schmelz-Prüfkörper ist primär 10 s mit Phosphorsäure behandelt und zur Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert. Im Gegensatz zu den Versuchen mit primär ungeätzttem Schmelz kann man sehr gut erkennen, wie weit die Pellikel in die Oberfläche eingedrungen ist und wie das Ätzmuster ausgefüllt wurde. Sie ist deutlich verdickt (Pfeile). Vergrößerung 30000x.

Ergebnisse

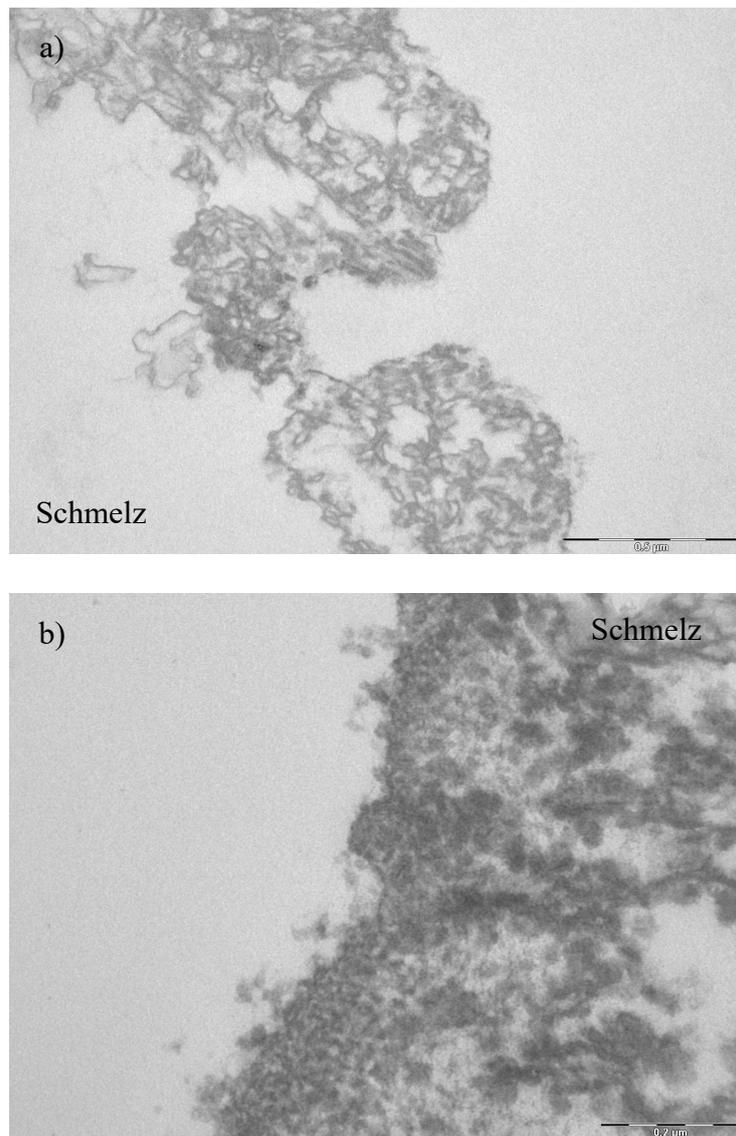


Abb. 22: TEM-Analyse. Der Schmelz-Prüfkörper ist primär 10 s geätzt und zur Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert. Die subsurface Pellikel wurde jetzt a) **10 s** b) **10 min** mit 1% **Tanninsäure** behandelt. Sie wirkt nach 10 min deutlich dicker und kompakter, verglichen mit der Kontrolle und der Probe nach der 10 s Polyphenolspülung. Vor allem nach 10 min ist eine deutlich erhöhte Elektronendichte der subsurface Pellikel erkennbar. Vergrößerung a) 48000x b) 98000x.

Ergebnisse

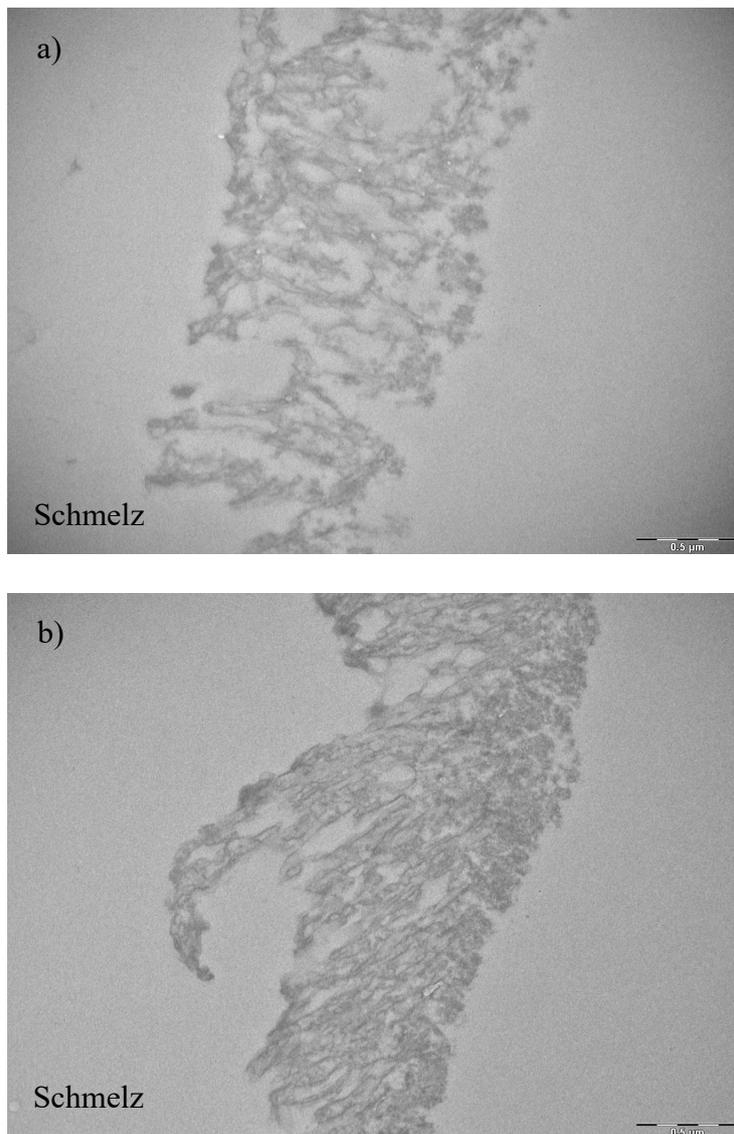


Abb. 23: TEM-Analyse. Der Schmelz-Prüfkörper ist primär 10 s geätzt und zur Pellicelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert. Die subsurface Pellicel wurde jetzt a) **10 s** b) **10 min** mit 0,01% **Epigallocatechingallat** behandelt. Sie wirkt nach der 10 min Spülung deutlich dicker, kompakter und elektronendichter, sowohl verglichen mit der Kontrolle, als auch verglichen mit der Probe, welche nur 10 s mit EGCG gespült wurde. Vergrößerung a) 30000x b) 48000x.

Ergebnisse

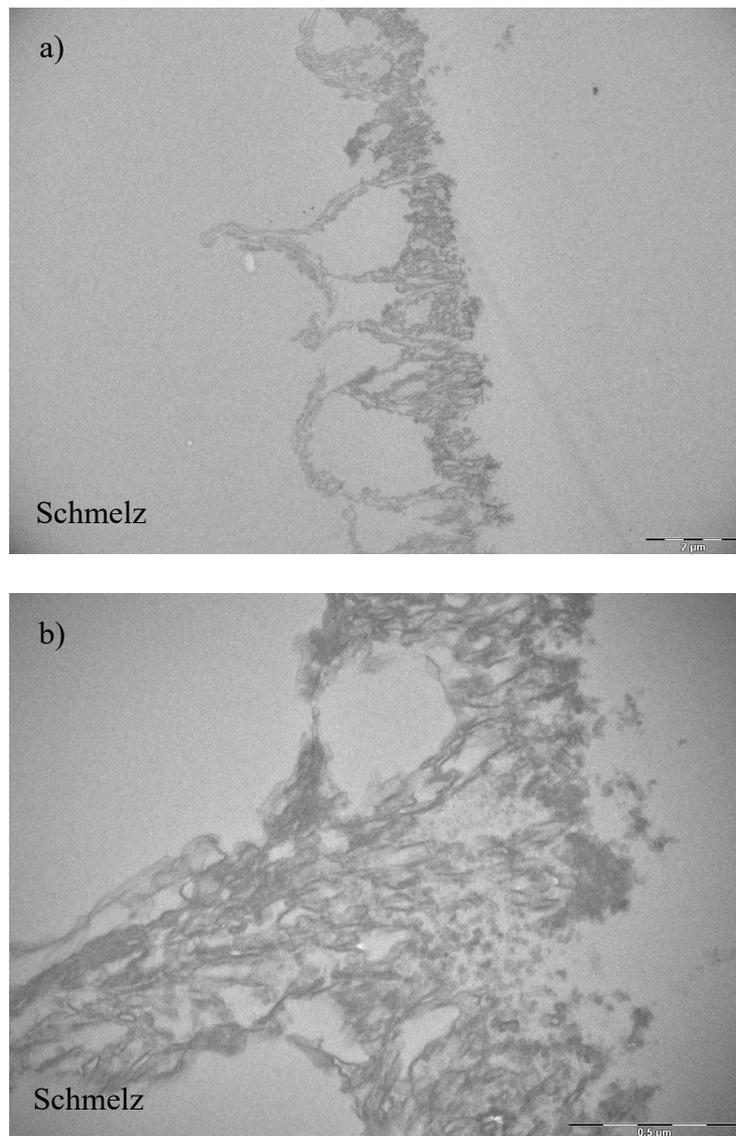


Abb. 24: TEM-Analyse. Der Schmelz-Prüfkörper ist primär 10 s geätzt und zur Pellicelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert. Die subsurface Pellicel wurde jetzt a) **10 s** b) **10 min** mit **experimentellem Hopfenextrakt** behandelt. Sie wirkt mit zunehmender Spüldauer deutlich dicker, kompakter und elektronendichter. Vergrößerung a) 6800x b) 49000x.

Nun werden die Proben dargestellt, welche nach der primären Ätzung, der 2 h Pellikelerzeugung und der Polyphenolspülung ein weiteres Mal mit der 37% Phosphorsäure behandelt wurden. Auch hier wurden zur Kontrolle Proben ohne Polyphenolbehandlung erstellt.

Auf dem TEM-Bild der Kontrollprobe mit der nicht modifizierten Pellikel war diese kaum noch erkennbar (Abb. 25). Die abschließende Phosphorsäureätzung hatte die Pellikel zum größten Teil entfernt. Dies wurde vor allem im Vergleich mit der Kontrolle des letzten Versuchs, ohne abschließende Ätzung, deutlich (Abb. 21). Allerdings schien die basale Schicht noch bestehen zu bleiben und in die Poren des Ätzmusters zu ziehen. Sie war sehr locker aufgebaut, mit großen Poren zwischen den verschiedenen organischen Bestandteilen.

Bei den Versuchen mit der Tanninsäure ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen der 10 s und der 10 min Spülung. Nach der 10 s Spülung wirkte die Pellikel etwas dicker und kompakter als in der Kontrolle, und auch die basale Schicht war hier besser erkennbar (Abb. 26a). Vor allem im Vergleich mit der ungeätzten Pellikel (Abb. 22a) wurde jedoch deutlich, dass die Phosphorsäure auch hier große Teile der Pellikel entfernt hat. Dahingegen wirkte die subsurface Pellikel nach vorheriger 10 min Tanninsäure-Spülung beinahe unversehrt (Abb. 26b). Sie erschien noch sehr kompakt und auch die Dicke war beinahe unverändert, verglichen mit der ungeätzten Probe (Abb. 22b).

Die Spülung mit Epigallocatechingallat schien keinen großen Effekt gehabt zu haben (Abb. 27). Die Versuche mit dem Hopfenextrakt zeigten sowohl nach 10 s, als auch nach 10 min Einwirkdauer eine noch deutlich vorhandene subsurface Pellikel (Abb. 28). Man konnte die noch erhaltene tiefe Infiltration der Pellikel in den Schmelz sehr gut erkennen. Sie wirkte jedoch, verglichen mit der Tanninsäure-Spülung, deutlich lockerer und weniger elektronendicht.

Ergebnisse

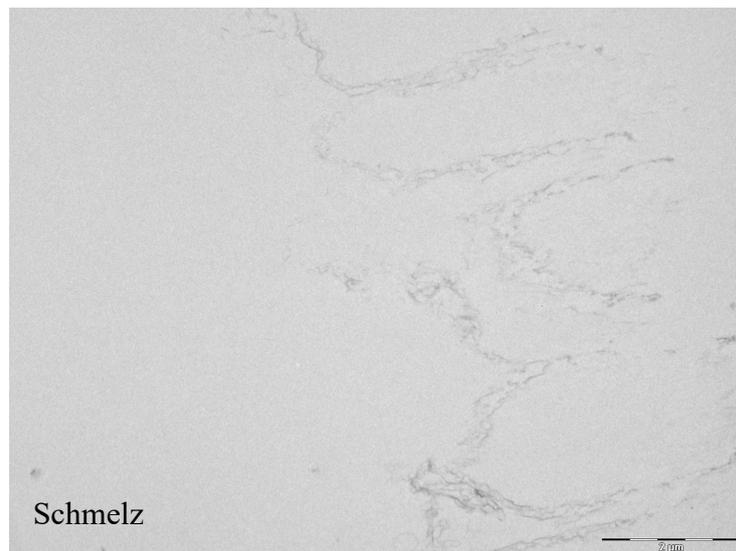


Abb. 25: TEM-Analyse. **Kontrolle.** Der Schmelz-Prüfkörper ist primär 10 s geätzt und zur subsurface Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert. Die Pellikel wurde jetzt erneut 10 s mit Phosphorsäure behandelt. Sie ist kaum noch erkennbar. Vergrößerung 9300x.

Ergebnisse

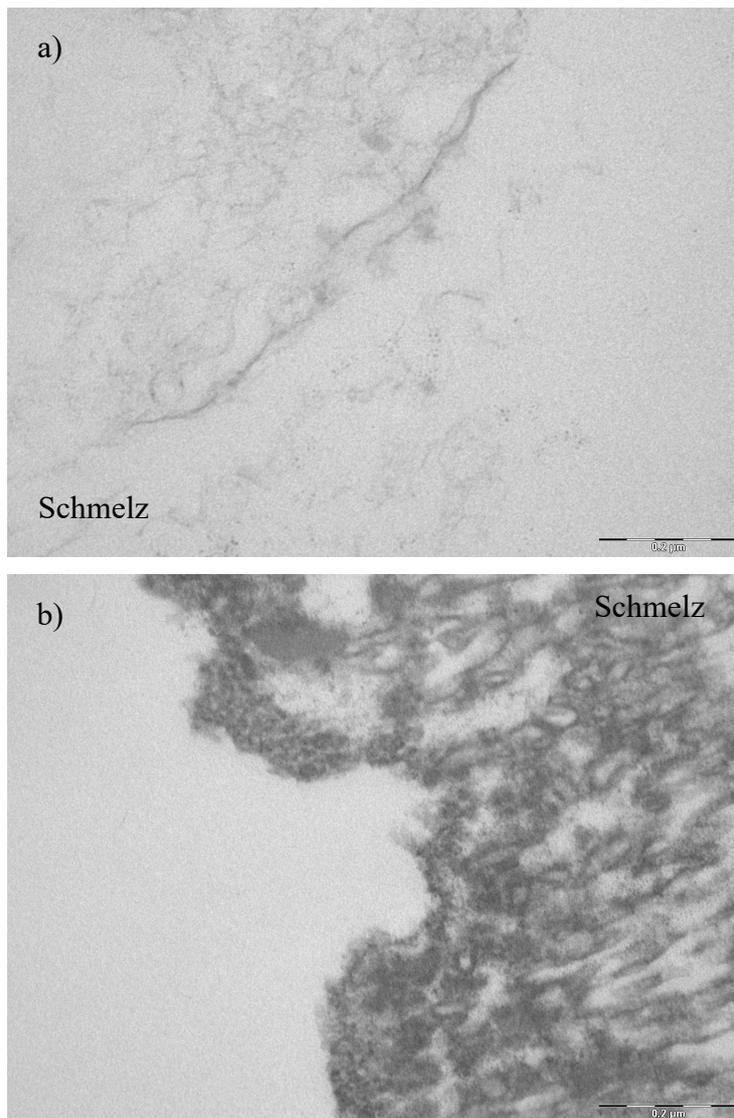


Abb. 26: TEM-Analyse. Der Schmelz-Prüfkörper ist primär 10 s geätzt und zur subsurface Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert. Die Pellikel wurde jetzt a) **10 s** b) **10 min** mit 1% **Tanninsäure**, behandelt, bevor sie erneut 10 s mit Phosphorsäure geätzt wurde. Sie wirkt nach der 10 min Spülung, verglichen mit der Kontrolle und der 10 s Polyphenol-Behandlung, deutlich dicker, kompakter und wesentlich elektronendichter. Vergrößerung 98000x.

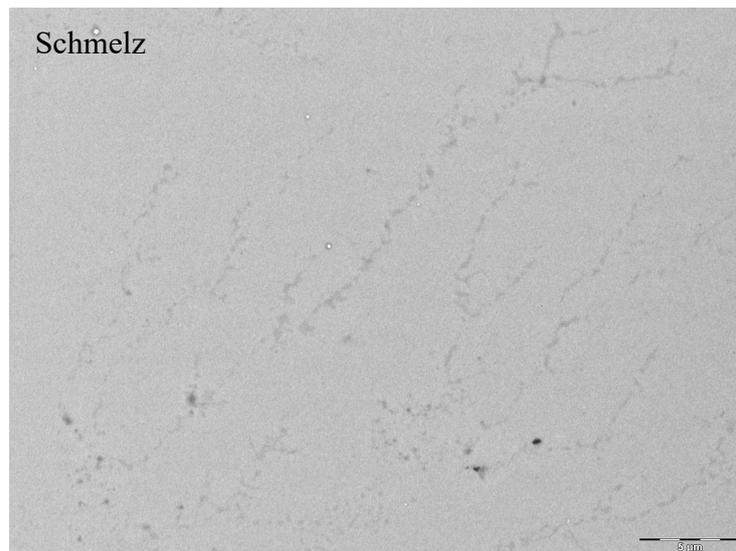


Abb. 27: TEM-Analyse. Der Schmelz-Prüfkörper ist primär 10 s geätzt und zur Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert. Die Pellikel wurde jetzt **10 s** mit 0,01% **Epigallocatechingallat** behandelt, bevor sie erneut 10 s mit Phosphorsäure geätzt wurde. Sie ist nur noch in Ansätzen erkennbar. Vergrößerung 2900x.

Ergebnisse

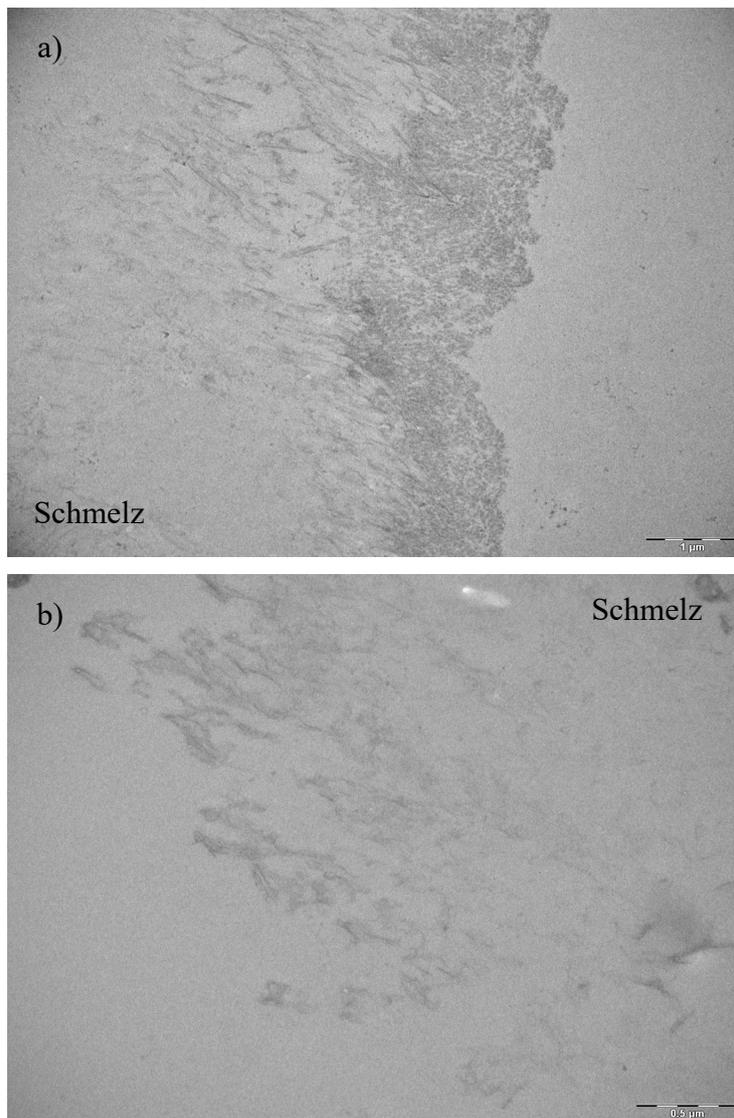


Abb. 28: TEM-Analyse. Der Schmelz-Prüfkörper ist primär 10 s geätzt und zur subsurface Pellikelbildung 2 h intraoral, bukkal exponiert. Die Pellikel wurde jetzt a) **10 s** b) **10 min** mit **experimentellem Hopfenextrakt** behandelt, bevor sie erneut 10 s mit Phosphorsäure geätzt wurde. Sie wirkt, verglichen mit der Kontrolle, dicker und kompakter. Vergrößerung a) 13000x b) 30000x.

Abschließend sind folgende Ergebnisse festzuhalten.

Die unbehandelte Pellikel, die sich den polierten Schmelz-Prüfkörpern auflagert (Abb. 16, 29a), wurde durch die Ätzung mit Phosphorsäure beinahe komplett entfernt. Allerdings waren noch einige Bereiche von der basalen Schicht bedeckt. Nach der Behandlung mit Polyphenolen erschien sie wesentlich dicker und dichter (Abb. 18, 29b) und auch gegenüber dem Säureangriff bestand jetzt eine gesteigerte Resistenz.

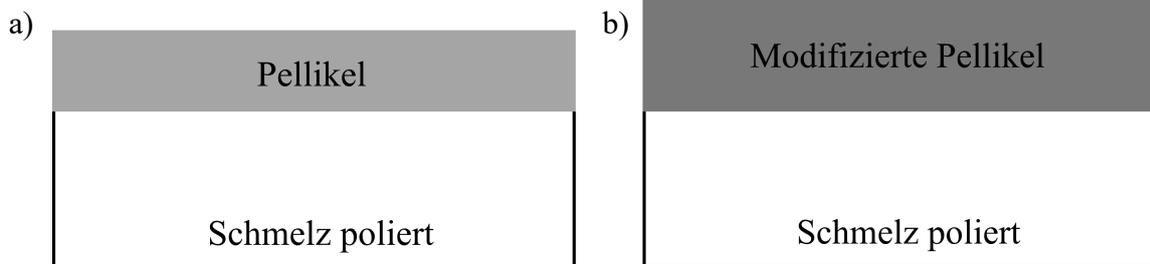


Abb. 29: Schema-Zeichnung. Pellikelbildung auf poliertem Schmelz. a) native, unbehandelte Pellikel und b) mit Polyphenolen modifizierte Pellikel

War der Zahnschmelz durch das Ätzen vorgeschädigt, legte sich die Pellikel in die dadurch entstandenen Poren und füllte diese aus (Abb. 21, 30a). Es bildete sich somit die subsurface Pellikel. Wie tief diese Poren reichten, und wie zerklüftet die Oberfläche war, erkannte man sehr gut auf den REM-Bildern der Blockface-Präparate (Abb. 20). Nach der Modifizierung mit Polyphenolen wirkte die entstandene subsurface Pellikel auf den TEM-Bildern deutlich verdickt und zusätzlich verdichtet (Abb. 22, 23, 24, 30b). Das war auch noch nach der abschließenden Ätzung mit Phosphorsäure zu beobachten (Abb. 26, 27, 28). Die Pellikel verblieb wesentlich dicker und kompakter auf dem Schmelz, was vor allem nach der Behandlung mit Tanninsäure und Hopfenextrakt zu beobachten war.

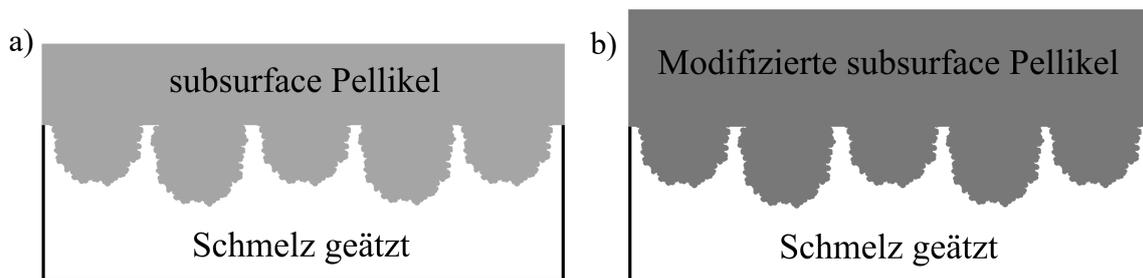


Abb. 30: Schema-Zeichnung. Bildung der **subsurface Pellikel** auf angeätztem, porösem Schmelz. a) native, unbehandelte subsurface Pellikel und b) mit Polyphenolen modifizierte subsurface Pellikel.

5. Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methoden

Die hier verwendete Methode der bovinen Zahnschmelz-Prüfkörper, die nach entsprechender Präparation auf individuell angefertigten Zahnschienen zur Exposition in der Mundhöhle aufgebracht wurden, hatte sich bereits in vielen Studien bewährt (Hannig M. et al. 2004; Hannig C. et al. 2009; Weber et al. 2015; Hertel et al. 2017; Rehage et al. 2017). Mit dieser Methode lässt sich die Pellikel relativ einfach über einen genau definierten Zeitraum *in-vivo* gewinnen. Die Prüfkörper sind standardisiert und auch in großer Stückzahl einfach reproduzierbar. Mit den dünnen Tiefziehschienen bietet sich ein komfortables, reversibles System, welches es ermöglicht, die Pellikel auch über einen langen Zeitraum zu gewinnen, da die Schiene zur Nahrungs- und Getränkeaufnahme leicht aus der Mundhöhle entnommen werden können. In dieser Studie war dies, aufgrund der kurzen Expositionszeit von 2 h, allerdings nicht notwendig. Ein weiterer Vorteil ergibt sich darin, dass die Schienen mit den Prüfkörpern nach der Pellikelgewinnung auch über einen kurzen Zeitraum bis zur Weiterverarbeitung in einem Hygrophor gelagert werden können. Zudem kann eine hohe Stückzahl an Proben gleichzeitig *in-situ* getragen werden. In diesem Versuch handelte es sich um bis zu sechs Prüfkörper pro Seite, da hier lediglich die bukkale Pellikel untersucht wurde. Positiv ist weiterhin, dass die Pellikel mitsamt der Prüfkörper entnommen, behandelt und fixiert werden kann, wodurch Struktur, Dicke und Elektronendichte hervorragend mittels REM bzw. TEM analysiert werden können.

Prüfkörper

Obwohl humaner Zahnschmelz den Bedingungen in der Realität am nächsten kommen würde, wurde hier, wie in vielen Studien zuvor, auf bovines Material zurückgegriffen (Oesterle et al. 1998; Hannig M. & Balz 1999; Hannig M. et al. 2003, 2004; Weber et al. 2015; Hertel et al. 2017; Rehage et al. 2017; Ortiz-Ruiz et al. 2018). Es steht in ausreichendem Maß zur Verfügung, um eine geeignete Menge homogener Proben zu fertigen und da es dem humanen Zahnschmelz strukturell sehr ähnlich ist, eignet es sich in klinischen Studien besonders gut als dessen Substitut (Esser et al. 1998; Oesterle et al. 1998; Turssi et al. 2010; Ortiz-Ruiz et al. 2018). Nachgewiesenermaßen stimmen sowohl Kalzium- und Phosphatgehalt als auch Mikrohärtigkeit und Dichte des bovinen Schmelzes weitgehend mit dem humanen Schmelz überein (Esser et al. 1998; Ortiz-Ruiz et al. 2018). Trotzdem darf die Tatsache nicht vernachlässigt werden, dass es sich nicht um äquivalente Materialien handelt (Hannig M. & Balz 2001). Das

bezieht sich im Speziellen auf die Demineralisationsrate und die Formation der Läsion (Hannig M. & Balz 2001). Die Demineralisation durch Erosion geht in bovinem Schmelz ca. doppelt so schnell voran, wie in menschlichem (Amaechi et al. 1999a; Attin et al. 2007). Auch strukturell ergeben sich mittels spektroskopischer und röntgenologischer Analysen einige geringe Unterschiede (Ortiz-Ruiz et al. 2018). So sind die Hydroxylapatitkristalle des humanen Schmelzes größer, während im bovinen Schmelz der interprismatische Raum und der Anteil des organischen Materials größer sind (Turssi et al. 2010; Ortiz-Ruiz et al. 2018).

Subsurface Pellikel

Zu Erzeugung, Verhalten und Aufbau der subsurface Pellikel ist bisher noch nicht sehr viel bekannt. Wie bereits in Kapitel 2. ausführlich beschrieben, handelt es sich dabei um die Pellikel, welche sich auf erodiertem Zahnschmelz bildet (Meckel 1968). Die bei der Erosion entstandenen Poren werden von dieser vollständig ausgefüllt, wobei sie der basalen Pellikelschicht demnach von unten anliegt (Meckel 1968; Hannig C. et al. 2009).

In der hier vorliegenden Studie wurde auf den Zahnschmelz-Prüfkörpern eine 2 h Pellikel *in-situ* gewonnen, mit welcher in der Vergangenheit bereits in vielen Studien erfolgreich gearbeitet werden konnte (Joiner et al. 2004; Hannig C. et al. 2008a, 2009; Wiegand et al. 2008; Ionta et al. 2017; de Souza-e-Silva et al. 2017). Hannig M. et al. (2003) beobachteten, dass sich eine 2, 6, 12 und 24 h alte *in-situ* gewonnene Pellikel nicht signifikant in ihrer Schutzfunktion gegenüber einem Zitronensäure-Angriff unterschieden. Die 2 h Pellikel reichte demnach aus, die Zahnschmelzoberfläche zu einem gewissen Grad gegen Demineralisation durch Erosion zu schützen. Diese Schutzfunktion konnte auch durch weitere Reifezeit der Pellikel nicht signifikant verbessert werden (Hannig M. et al. 2003). Auch wenn ein gewisser Schutz bereits bei einer 3 min alten Pellikel nachgewiesen wurde, so scheint eine weitere Pellikelreifung, auch bezogen auf die Säureresistenz, nicht zu schaden (Hannig M. et al. 2003, 2004; Hannig M. & Joiner 2006; Lee et al. 2013; Zhang et al. 2015). Featherstone und Lussi (2006) beobachteten sogar, dass die *in-situ*-Pellikel erst ab einem Alter von 3 h dazu in der Lage war, die subsurface Region merklich zu schützen. Erst jetzt formte sie in deren *in-vitro*-Experiment eine suffiziente, partielle Diffusionsbarriere, sodass das H⁺-Ion zunächst in seiner undissoziierten Form in diese Region hinein diffundieren musste, bevor es diese angreifen konnte (Featherstone & Lussi 2006).

Phosphorsäure

Um die erforderliche Erosion des Zahnschmelzes nachzuahmen, wurden die Prüfkörper nach der Politur mit 37%iger Phosphorsäure behandelt. Es entstand das charakteristische Ätzmuster, welches auf den REM-Bildern besonders gut zu beobachten ist (Abb. 5).

Für die Simulation der Zahnschmelz-Erosion, welche benötigt wurde um die subsurface Pellikel zu erzeugen, wurden in dem vorliegenden Experiment die Prüfkörper nach der Politur mit 37%ige Phosphorsäure behandelt.

Phosphorsäure ist eine mittelstarke, dreiprotonige Säure, mit dementsprechend drei PKa-Werten, die bei 2.15, 7.20 und 12.35 liegen (Featherstone & Lussi 2006). In saurem Milieu, z.B. bei einem pH-Wert von 2, stellt sie Wasserstoffionen (H^+) zur Verfügung, welche, bei Kontakt zur Zahnoberfläche, diese direkt angreifen können (Featherstone & Lussi 2006). Bei höheren pH-Werten, wie z.B. 7, ist die Säure dazu in der Lage, Calcium zu binden und diesen somit aus dem Schmelz zu entfernen (Featherstone & Lussi 2006). In den Bereichen zwischen den niedrigen und den höheren pH-Werten sind beide Mechanismen wirksam (Featherstone & Lussi 2006). Phosphorsäure kommt auch in Lebensmitteln, z.B. in Cola-Getränken vor (Featherstone & Lussi 2006).

In einer Studie von Wiegand et al. (2008) wurde eine 120 min *in-vivo*-Pellikel auf bovinen Schmelz- und Dentin-Prüfkörpern hinsichtlich ihrer Säureresistenz gegenüber Salz-, Zitronen- und Phosphorsäure getestet. Nach jeweils 60 s Inkubation der Pellikel in der entsprechenden Säure wurde der Kalziumverlust der Prüfkörper mittels Atomabsorptionsspektrometrie gemessen, um den Grad der Demineralisation festzustellen. Bezogen auf den Schmelz fand man heraus, dass die nicht pellikelbedeckten Kontroll-Prüfkörper signifikant mehr Kalziumverlust zeigten als die pellikelbedeckten, während man diesbezüglich im Vergleich der verschiedenen Säuren untereinander keinen Unterschied feststellte (Wiegand et al. 2008). Aufgrund dieser Tatsache, der guten Verfügbarkeit und der komfortablen Handhabung wurde in diesem Versuch 37%ige Phosphorsäure in Form eines blau eingefärbten Gels verwendet, dessen pH-Wert sich laut Herstellerangaben auf 0.5-1.5 beläuft (Gel Etchant, Kerr Italia). Das erosive Potential der Phosphorsäure wurde im Vergleich mit anderen reinen Säuren, wie z.B. HCl, Milch-, Zitronen- und Essigsäure, von Hannig C. et al. (2005 a) getestet. Bei den verschiedenen pH-Werten von 2, 2.5 und 3 verursachte diese eine mittelstarke Erosion, welche sich erwartungsgemäß mit sinkendem pH-Wert deutlich verstärkte (Hannig C. et al. 2005a).

Polyphenole

Zur Modifikation der Pellikel wurden in der vorliegenden Studie drei verschiedene Polyphenole verwendet. Die Tanninsäure hatte schon in vielen *in-situ/ex-vivo*-Studien, in denen es darum ging das Verhalten der Pellikel zu studieren, die erwünschten Erfolge gezeigt (Joiner et al. 2004; Hertel et al. 2017; Rehage et al. 2017). Die 1%ige Konzentration findet sich unter anderem in der Studie von Joiner et al. 2004 wieder (Joiner et al. 2004). Auch EGCG zeigte, als Vertreter der reinen Polyphenole, einen ähnlichen Effekt auf die Pellikel wie die Tanninsäure (Joiner et al. 2004; Rehage et al. 2017; de Souza-e-Silva et al. 2017). Joiner et al. (2004) wählten in einer Studie über das Verhalten der *in-vivo*-Pellikel mit 0,015% eine ähnliche Verdünnung des EGCG wie in der vorliegenden Studie (0,01%). Die dritte polyphenolhaltige Substanz war ein experimentelles, wässriges Hopfenextrakt. In einigen Studien konnte bereits der positive Effekt von Hopfenextrakten auf die Gesundheit generell, aber im Speziellen auch auf die Zahngesundheit dargestellt werden. Es bestand also die Hypothese, dass dies auch im vorliegenden Versuch der Fall sein sollte (Inaba et al. 2005; Shinada et al. 2007; Tanaka et al. 2014; Pilna et al. 2015; Wei et al. 2018; Ambrož et al. 2019; Kobus-Cisowska et al. 2019). Bei der Interpretation der Ergebnisse ist auch der pH-Wert der Polyphenole nicht zu vernachlässigen. So hat die Tanninsäure, einen sauren pH-Wert, der sich auf 2.91 beläuft. Auch das experimentelle Hopfenextrakt reagiert noch leicht sauer mit einem pH-Wert von 4.7, während der von 0,01% EGCG mit einem Wert von 6.0 im neutralen Bereich liegt.

In den Vorversuchen kamen noch weitere Substanzen zum Einsatz. Dazu gehörte die Gallotanninsäure, eine Tanninsäure die zu den hydrolysierbaren Tanninen gezählt wird (Lasswell et al. 1984). Sie entsteht aus der Gallussäure durch Veresterung derer Zuckerreste und wurde im vorliegenden Versuch in 1%iger Verdünnung eingesetzt (Niemetz & Gross 2005).

Eine weitere Testsubstanz war das Theranovis Gel (Theranovis, Bingen), bestehend aus Ölen von Grapefruitsamen (Citrus Grandis seed oil), Thymian (thymus vulgaris oil), Pfefferminze (Mentha piperita oil), Rosmarin (Rosmarinus officinalis leaf oil) und aus Traubenkernen (Vitis vinifera seed oil). Bei all diesen Ölen handelt es sich um polyphenolhaltige Substanzen, die hier in einem Gel zur Anwendung auf den Zähnen zusammengefügt wurden (Faria et al. 2006; Salaaheen et al. 2014; Pérez-Sánchez et al. 2017; Yang et al. 2017; Schött et al. 2017).

Die dritte Substanz war das Thymol, das wohl wichtigste monoterpenoide Phenol, welches in Pflanzen, wie unter anderem Thymian und Oregano, vorkommt (Roufegarinejad et al.; Saravanan & Pari 2015). Es konnte bereits bestätigt werden, dass Öle, welche hauptsächlich

Thymol enthalten, antinozizeptive, antiinflammatorische und geringe antioxidative Eigenschaften besitzen (Mendes et al. 2010). Des Weiteren ist Thymol auch für seine antiseptischen, antibakteriellen und antifungalen Eigenschaften bekannt (Marchese et al. 2016). Thymol findet vielfach Anwendung als Bestandteil in Kosmetika, in der Nahrung als Schutz vor Mikroorganismen und als Geschmacksverstärker, in Insektiziden, Fungiziden und als Raumerfrischer (Marchese et al. 2016). Aufgrund der bewiesenen Zytotoxizität ist der Einsatz von Thymol in Medikamenten stark limitiert auf solche zur äußeren Anwendung (Manabe et al. 1987; Suzuki et al. 1987). Dies ist auch der Grund, warum es hinsichtlich seiner Wirksamkeit auf die Pellikel nicht klinisch relevant ist und somit in den weiteren Versuchen keine weitere Verwendung findet (Manabe et al. 1987; Suzuki et al. 1987).

Elektronenmikroskopische Analyse

Zur Analyse der Ergebnisse wurde im vorliegenden Versuch das Raster- und das Transmissionselektronenmikroskop verwendet. Mit Hilfe des REM konnten in den Vorversuchen Ergebnisse beobachtet werden, die den Erwartungen entsprachen. Man sah eine erhöhte Dichte der Pellikel nach der Behandlung mit Polyphenolen, insbesondere mit Tanninsäure und Thymol, verglichen mit der Kontrolle ohne Modifizierung. Diese erhöhte Dichte der modifizierten Pellikel ließ sich auch nach der abschließenden Behandlung mit Phosphorsäure nachweisen. Jedoch erreichte das REM bei der Beurteilung der Dicke der Pellikel seine Grenze. Vor allem im Hinblick darauf, inwiefern die modifizierte Pellikel einem erneuten Säureangriff standhält, wäre dies jedoch interessant zu wissen, um den Erfolg der Polyphenole beurteilen zu können. Auch nach Aufarbeitung der Proben als Blockface-Präparat war die Leistung dieses Mikroskops nicht ausreichend. Hierbei sollte es durch seitliches Anschleifen der Proben ermöglicht werden, die Pellikeldicke in der seitlichen Aufsicht analysieren zu können. Als nächster Schritt war in den Hauptversuchen die Analyse mittels TEM erforderlich, wodurch die Dicke der Pellikel sehr gut beurteilt werden konnte. Diese Methode hatte sich auch in diversen vorherigen Studien als gute, sensitive Methode erwiesen, um ultrastrukturelle Veränderungen sowie die Dicke und Elektronendichte der Pellikel darstellen zu können (Hannig M. & Balz 2001; Hannig M. et al. 2003; Hannig C. et al. 2009; Weber et al. 2015; Hertel et al. 2017; Rehage et al. 2017).

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Diskussion der Vorversuche

Mit Hilfe der Vorversuche sollte der genaue Versuchsaufbau, also die verschiedenen Parameter für die Hauptversuche festgelegt werden.

Um die erforderlichen Porositäten zur Erzeugung einer subsurface Pellikel herzustellen, musste der Prüfkörper nach der Politur angeätzt werden. Hierfür wurden verschiedene Einwirkzeiten der 37%igen Phosphorsäure getestet, wobei es sich um 10, 30 und 60 s handelte. Bereits nach einer Einwirkdauer von 10 s sah man das charakteristische mikroretentive Ätzmuster mit der zerklüfteten Oberfläche (Abb. 5a), welches durch die unterschiedliche Löslichkeit der Schmelzprismen im Zentrum und in der Peripherie entsteht (Frankenberger & Tay 2005). Nach 30 und 60 s wirkte dieses zwar etwas deutlicher (Abb. 5b, c), jedoch war der Unterschied nur gering, weshalb man sich für die Hauptversuche auf eine Einwirkdauer von 10 s festlegte.

Der nächste Schritt galt der Erzeugung der Pellikelschicht, also der Bestimmung der Tragedauer der Schienen. Auf den polierten Prüfkörpern konnte man sowohl nach 30 min wie auch nach 2 h eine gleichmäßige Schicht ausmachen (Abb. 6). Auch die subsurface Pellikel nach vorheriger Ätzung war gut erkennbar (Abb. 7). Das Ätzmuster war zwar noch zu sehen, aber die Pellikel hatte sich auch hier gleichmäßig über die Schmelzprismen gelegt. Auch wenn ein Schutz gegenüber Säuren bereits bei einer 3 min Pellikel nachweisbar ist, gibt es einige *in-situ/ex-vivo*-Studien, die mit zunehmendem Alter eine zunehmende Reifung der Pellikel beobachteten, die dazu führte, dass deren Säureschutz weiterhin verbessert wurde (Hannig M. et al. 2003, 2004; Hannig M. & Joiner 2006). Aus diesem Grund wurde sich auch in diesem Versuch dafür entschieden, mit einer 2 h Pellikel zu arbeiten (Abb. 6b, 7a).

Nun ging es um die Modifikation der Pellikel mit Polyphenolen. Dass es möglich ist, die Pellikel auf verschiedene Weise zu modifizieren, wurde bereits in einzelnen Studien gezeigt. Die wohl bekannteste Möglichkeit ist die Behandlung mit Fluoriden. Durch deren Applikation lässt sich sowohl die Struktur, als auch die Funktion der Pellikel verändern (Siqueira et al. 2012a; Algarni et al. 2015; Manarelli et al. 2017; Kensche et al. 2017). Siquiera et al. (2012a) zeigten, dass das Proteom der Pellikel, und somit indirekt auch die Biofilmbildung, sowohl qualitativ als auch quantitativ durch die Behandlung mit Fluoriden beeinflussbar ist. Besonders auffällig war hier der Rückgang wichtiger Speichelproteine wie Statherin und Histatin 1 mit einer Erhöhung der Fluoriddosis (Siqueira et al. 2012a). Außerdem kamen verschiedene *in-situ/ex-vivo*-Studien zu dem Ergebnis, dass die Resistenz der Pellikel gegenüber einer Erosion

durch die Behandlung mit Fluoriden gesteigert werden kann (Algarni et al. 2015; Kenschke et al. 2017).

Seit einiger Zeit werden an dieser Stelle aber auch die Polyphenole zur Modifikation der Pellikel studiert. Es konnte bereits belegt werden, dass Polyphenole, vor allem die Tanninsäure und EGCG von der Pellikel absorbiert werden (Joiner et al. 2004). Dadurch wird diese in ihrer Ultrastruktur verändert, wodurch sie jetzt sowohl dicker als auch elektronendichter erscheint (Hertel et al. 2017; Rehage et al. 2017). Auch in der hier vorliegenden Studie konnte das erneut bestätigt werden. Vor allem die Tanninsäure erwies sich bereits in den Vorversuchen hinsichtlich ihrer Elektronendichte sowie der Darstellbarkeit der Pellikel als überlegen (Abb. 8,9). Jedoch wird nicht nur ihre Struktur, sondern auch ihre Funktion und ihr Verhalten durch die Modifikation mit Polyphenolen verändert. So konnte von Hannig C. et al. (2008a) nachgewiesen werden, dass durch *in-situ*-Spülung mit Cistus-Tee, welcher reich an Polyphenolen ist, die Zahl der adhärennten Bakterien an der Pellikel signifikant gesenkt werden kann. Auch die Aktivität der Peroxidase wird erheblich vermindert, während auf Lysozym, Amylase und Glycosyltransferase keine Auswirkungen festgestellt wurden (Hannig C. et al. 2008a). In jüngsten *in-situ/ex-vivo*-Studien fand man zudem heraus, dass die Pellikel nach der Modifikation mit Polyphenolen eine gesteigerte Resistenz gegenüber einem Angriff von Säuren aufweist (Weber et al. 2015; Hertel et al. 2017).

Weber et al. (2015) untersuchten die Auswirkungen verschiedener polyphenolhaltiger Pflanzenextrakte (Oregano und schwarze Johannisbeere) auf die *in-situ* gebildete Pellikel. Zwölf Probanden trugen bovine Prüfkörper auf individuellen Oberkieferschienen. Nach 1 min spülten sie *in-vivo* für 10 min mit einer der beiden Lösungen, und beließen die Prüfkörper für weitere 19 bzw. 28 min *in-situ*. Jetzt wurden die Prüfkörper für 120 s in Salzsäure (HCl) inkubiert und anschließend konnte deren Kalzium- und Phosphatverlust photometrisch gemessen werden, um die Demineralisation zu bestimmen. Bei beiden Substanzen zeigte sich ein verbesserter protektiver Effekt der Pellikel (Weber et al. 2015). Auch Hertel et al. (2018) zeigten einen signifikant verbesserten Erosionsschutz der Pellikel nach deren Modifikation mit Tanninsäure. Der Versuchsaufbau war ähnlich dem von Weber et al. (2015), jedoch wurden die Prüfkörper nach 10 min *in-vivo* Spülung mit Tanninsäure für weitere 19 min, 109 min und 8 h *in-situ* belassen, bevor sie 120 s mit HCl inkubiert wurden (Hertel et al. 2017).

Im Unterschied zu den beiden beschriebenen Untersuchungen wurde in der vorliegenden Studie *ex-vivo* mit den Polyphenolen gespült. In den Vorversuchen kamen verschiedene Polyphenole und ein Phenol zum Einsatz.

Die 1%ige Tanninsäure lieferte in diesem Versuch, den Erwartungen entsprechend, die besten Ergebnisse (Abb. 8, 9). Schon nach 10 s Spüldauer (Abb. 8a) erkannte man deutlich, wie sich die modifizierte Pellikel zwischen die Schmelzprismen einlagerte. Die Oberfläche erschien geebnet, verdichtet und verklebt. Dieses Bild verstärkte sich noch bis hin zu einer Spüldauer von 10 min (Abb. 9a), während nach 20 und 30 min (Abb. 9b, c) kein Unterschied mehr erkennbar war. Das Ätzmuster war mit zunehmender Einwirkdauer der Tanninsäure immer weniger zu erkennen.

Nach der Spülung mit 1%iger Gallotanninsäure erschien die Pellikel auf den REM-Bildern auch verdichtet und die Oberfläche geebnet (Abb. 10) als auf den Bildern mit der nativen Pellikel (Abb. 7a). Im Vergleich mit der Tanninsäure (Abb. 8, 9) konnte sie jedoch nicht überzeugen. Das TheraNovis Gel war durch seine Struktur deutlich schwieriger zu handhaben als die anderen Lösungen. Auf den REM-Bildern (Abb. 12) sah man deutliche Verklebungen der Schmelzoberfläche, welche darauf zurückzuführen waren, dass sich das Gel nach der entsprechenden Einwirkdauer nur schwer von den Prüfkörpern entfernen ließ. Für den hier geplanten Versuch erschien diese Substanz somit unbrauchbar.

Das Thymol ist ein Vertreter der Phenole und lieferte im vorliegenden Versuch die erwarteten Ergebnisse (Abb. 11). Aufgrund seiner Toxizität war es zwar für den weiteren klinischen Versuch nicht relevant, jedoch war es interessant zu erkennen, dass es als reines Phenol einen ähnlichen Effekt hervorrief wie die Polyphenole.

In Bezug auf die Dauer der Spülung zeigten sich bei allen Substanzen bereits nach 10 s (Abb. 8a, 10a, 11a, 12a) erste Effekte gegenüber der Kontrolle ohne Polyphenolspülung. Bei der Tanninsäure waren die Veränderungen nach 10 min (Abb. 9a) noch deutlicher zu beobachten. Diese ließen sich jedoch nach 20 und 30 min nicht wesentlich verstärken (Abb. 9b, c). Aus diesen Gründen wurden sowohl 10 s, als auch 10 min als Spüldauer für die weiteren Versuche festgelegt.

Zur Simulation des wiederholten Säureangriffs mussten die Prüfkörper mit der modifizierten Pellikel erneut mit 37%iger Phosphorsäure geätzt werden. Diese sollte analog zur ersten Ätzung ebenso 10 s erfolgen (Abb. 13). Bis heute konnten viele Studien zeigen, dass bereits die unbehandelte Pellikel eine gewisse Schutzfunktion für die Zahnoberfläche gegenüber eines Säureangriffs bietet (Hannig M. & Balz 1999; Hannig M. 2002; Hannig M. et al. 2003, 2004; Hannig M. & Joiner 2006; Hannig C. et al. 2009). So studierten z.B. Hannig M. et al. (2004) das Verhalten von 3, 60 und 120 min *in-situ* erzeugten Pellikelschichten, welche für 60 s *in-vitro* mit 0,1% Zitronensäure behandelt wurden. Sie fanden heraus, dass die Pellikel einen signifikanten Schutz der Zahnschmelzoberfläche bieten kann, da die Knoop-Mikrohärte der

Schmelzproben weniger reduziert war, wenn eine Pellikel vorhanden war. Und auch die Demineralisation, gemessen am Kalziumverlust der Prüfkörper, war bei pellikelbedeckten Proben weniger stark ausgeprägt als bei den Kontrollen ohne Pellikel. Sowohl bei der Mikrohärtigkeit als auch beim Kalziumverlust hatte die Reifezeit der Pellikel keinen signifikanten Einfluss auf die protektiven Eigenschaften (Hannig M. et al. 2004). Des Weiteren fand man heraus, dass die Schutzfunktion vor allem von der basalen Pellikelschicht abhängig ist (Hannig M. 2002; Hannig C. et al. 2009). So ist auf TEM-Bildern aus einer Publikation von Hannig M. (2002) erkennbar, dass sich die weniger dichte, locker arrangierte, äußere Schicht einer 2 h *in-vivo*-Pellikel vergleichsweise leicht durch die 60 s Behandlung mit 0,1% Zitronensäure entfernen ließ. Dahingegen wies die elektronendichte basale Schicht eine höhere Säureresistenz auf, was sich auch in dem hier vorliegenden Versuch bestätigte (Hannig M. 2002).

Im Vorversuch wurde die Pellikel nach der Modifikation mit Tanninsäure (Abb. 15) und Thymol (Abb. 14) erneut geätzt, daraufhin zeigten sich im REM deutliche Unterschiede zur nativen Pellikel (Abb. 13). Das Ätzmuster war weniger gut erkennbar und man erkannte deutliche Rückstände der Pellikel. Dies sprach wie erwartet bereits für einen verbesserten Säureschutz, was aber in den Hauptversuchen bestätigt werden sollte.

5.2.2 Diskussion der Hauptversuche

Schon auf den TEM-Bildern der unbehandelten 2 h Pellikel war ihr bereits 1999 von Hannig M. beschriebener zwei-schichtiger Aufbau gut erkennbar (Abb. 16) (Hannig M. 1999). Man konnte dementsprechend deutlich eine basale elektronendichte Schicht sehen, welcher sich eine lockere Schicht aus organischen Speichelbestandteilen aufgelagert hatte (Hannig M. 1999). Diese war nach Modifikation der Pellikel mit Tanninsäure noch deutlicher auszumachen, außerdem erschien die Pellikel nun dicker und elektronendichter (Abb. 18). Das Ergebnis, welches sich bei der Darstellung der subsurface Pellikel zeigte, entsprach den Erwartungen. Schon die native Pellikel wirkte nach vorheriger Ätzung um ein vielfaches verdickter (Abb. 21) als die Pellikel auf poliertem Schmelz (Abb. 16) und man erkannte gut, wie sie sich in die entstandenen Poren legte. Diese Ergebnisse entsprachen den Erwartungen. Sie stimmten mit denen der wenigen bisherigen Studien überein, wie der von Meckel, welcher die subsurface Pellikel 1965 als erster beschrieb, und der von Hannig C. et al. aus dem Jahr 2009, in der die Füllung der Lacunen in TEM-Aufnahmen beobachtet werden konnte (Meckel 1965; Hannig C. et al. 2009). Dies wurde nach der Spülung mit den Polyphenolen noch deutlicher (Abb. 22, 23, 24). Die subsurface Pellikel zeigte sich nun nicht nur verdickt, sondern zudem auch noch deutlich elektronendichter und kompakter.

Der nächste Schritt der vorliegenden Studie war nun die Ätzung der subsurface Pellikel für 10 s mit 37%iger Phosphorsäure. Nachdem die native Pellikel auf poliertem Schmelz bereits eine geringe erhöhte Säureresistenz und somit verbesserte Schutzwirkung gezeigt hatte (Abb. 19), bestand die Hypothese, dass dies verstärkt auch für bereits erodierten Schmelz gilt. Die TEM-Aufnahmen des aktuellen Versuchs schienen diese Hypothese zu bestätigen. Verglichen mit den Kontrollen der nativen Pellikel (Abb. 25) waren deren Rückstände nach der Modifikation deutlich vermehrt (Abb. 26, 27, 28). Vor allem für die Spülung mit Tanninsäure (Abb. 26) und Hopfenextrakt (Abb. 28) war das Ergebnis sehr deutlich. Bei beiden Substanzen war die Pellikel nach der erneuten Ätzung auf den TEM-Bildern noch deutlich und kontinuierlich nachweisbar. Das ist auch im Hinblick darauf interessant, dass die beiden Substanzen mit den pH-Werten 2.91 (Tanninsäure) bzw. 4.7 (Hopfenextrakt) selbst zusätzlich sauer reagierten. Das Ergebnis für EGCG war nicht überzeugend (Abb. 27), was gegebenenfalls an der geringen Konzentration der Lösung von 0,01% lag.

Das Resultat ist dahingehend relevant, dass erodierter, vorgeschädigter Zahnschmelz in der Realität wesentlich häufiger zu finden ist als unversehrter Schmelz. Wie bereits zu Beginn erwähnt, nimmt der Schaden durch die Erosion der Zahnhartsubstanz, angesichts des zunehmenden Konsums von Soft- und Energydrinks in unserer Gesellschaft, immer weiter zu (Lussi & Carvalho 2015). Fluoride, welche weitverbreitet unter anderem in Zahnpasta und Mundspüllösungen zu finden sind, scheinen für sich alleine Folgeschäden wie Karies und Parodontitis nicht ausreichend vorzubeugen zu können (Lussi & Carvalho 2015). Darum sollte weiterhin besonderes Augenmerk auf alternative Substanzen gerichtet werden, die verglichen mit den Fluoriden, einen besseren Erosions-Schutz bieten können. Polyphenole scheinen hier ein erfolgsversprechender Ansatz zu sein. Einige *in-situ/ex-vivo*-Studien konnten, genau wie die vorliegende, den protektiven Effekt der Polyphenole bereits bestätigen (Weber et al. 2015; Hertel et al. 2017). Die Kenntnis über die Möglichkeiten der Pellikelmodifikation mittels Polyphenolen und die damit verbundenen Änderungen derer Struktur und Funktion können zur Entwicklung neuer therapeutischer Maßnahmen beitragen.

Allerdings sind an dieser Stelle noch weitere Untersuchungen notwendig, die z.B. den Effekt der modifizierten Pellikel auf Dentin untersuchen. Man konnte bereits feststellen, dass die native *in-situ* erzeugte Pellikel hier als Ionen-durchlässiges Netzwerk fungiert und nur in geringem Maße dazu in der Lage ist, das darunterliegende Dentin vor einer Erosion zu schützen (Hannig C. et al. 2007). Durch Modifikation der Pellikel mit grünem Tee, der zu einem großen Teil EGCG enthält, konnte aber ein gesteigerter Schutz des Dentins gegenüber erosiver

Attacken beobachtet werden (De Moraes et al. 2016). Das Verhalten der Pellikel könnte hier noch weiter studiert werden, auch im Hinblick auf bereits erodiertes Dentin.

Schlussfolgerung

In dieser Studie konnte erneut bestätigt werden, dass die Pellikel den darunterliegenden Zahnschmelz vor erosiven Attacken zu schützen vermag. Diese Schutzfunktion kann gesteigert werden, wenn die Pellikel zuvor mit Polyphenolen behandelt wird. Auch auf bereits erodiertem Schmelz lässt sich dieser erhöhte Schutz der modifizierten Pellikel beobachten, womit die zu Beginn aufgestellte Hypothese bestätigt werden konnte. Wichtig sind diese Ergebnisse vor allem für die zukünftige Prophylaxe von Zahnhartsubstanzschäden, die unter anderem als Folge der Erosion auftreten und vor der Erosion selbst. Vor der Entwicklung neuer therapeutischer Maßnahmen im Zusammenhang mit Polyphenolen sind allerdings zukünftig noch weitere Untersuchungen notwendig. So könnte der protektive Effekt weiterhin bestätigt werden, indem man z.B. die Mikrohärtigkeit oder den Kalzium- und Phosphatverlust der Prüfkörper misst. Zudem könnten die Ergebnisse dieser Studie mit einer größeren Anzahl an Probanden weiter verifiziert werden und auch eine *In-vivo*-Spülung mit den polyphenolhaltigen Lösungen würde voraussichtlich Ergebnisse liefern, die näher an der Realität liegen.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Agarwal R, Katiyar SK, Zaidi SIA & Mukhtar H (1992). Inhibition of Skin Tumor Promoter-caused Induction of Epidermal Ornithine Decarboxylase in SENCAR Mice by Polyphenolic Fraction Isolated from Green Tea and Its Individual Epicatechin Derivatives. *Cancer Res.* 52(13): 3582–3588.
- 2 Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, Oono T & Iwatsuki K (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 48(4): 487–491.
- 3 Algarni AA, Mussi MCM, Moffa EB, *et al.* (2015). The Impact of Stannous, Fluoride Ions and Its Combination on Enamel Pellicle Proteome and Dental Erosion Prevention. *PLoS ONE.* 10(6): e0128196
- 4 Al-Hashimi I & Levine MJ (1989). Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. *Arch Oral Biol.* 34(4): 289–295.
- 5 de Almeida PDV, Grégio AMT, Machado MAN, de Lima AAS & Azevedo LR (2008). Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract.* 9(3): 72–80.
- 6 Amaechi BT, Higham SM & Edgar WM (1999a). Factors influencing the development of dental erosion in vitro: enamel type, temperature and exposure time. *J Oral Rehabil.* 26(8): 624–630.
- 7 Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM & Milosevic A (1999b). Thickness of Acquired Salivary Pellicle as a Determinant of the Sites of Dental Erosion. *J Dent Res.* 78(12): 1821–1828.
- 8 Amararathna M, Johnston MR & Rupasinghe HPV (2016). Plant Polyphenols as Chemopreventive Agents for Lung Cancer. *Int J Mol Sci.* 17(8): 1352
- 9 Ambrož M, Lněničková K, Matoušková P, Skálová L & Boušová I (2019). Antiproliferative Effects of Hop-derived Prenylflavonoids and Their Influence on the Efficacy of Oxaliplatin, 5-fluorouracil and Irinotecan in Human ColorectalC Cells. *Nutrients.* 11(4): 879.
- 10 Armstrong WG (1968). Origin and nature of the acquired pellicle. *Proc R Soc Med.* 61(9): 923–930.
- 11 Attin T, Wegehaupt F, Gries D & Wiegand A (2007). The potential of deciduous and permanent bovine enamel as substitute for deciduous and permanent human enamel: Erosion-abrasion experiments. *J Dent.* 35(10): 773–777.
- 12 Björck L, Akesson P, Bohus M, *et al.* (1989). Bacterial growth blocked by a synthetic peptide based on the structure of a human proteinase inhibitor. *Nature.* 337(6205): 385–386.

- 13 Bravo L (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev.* 56(11): 317–333.
- 14 Davey ME & O’toole GA (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64(4): 847–867.
- 15 Dawes C, Jenkins GN & Tonge CH (1963). The Nomenclature of the Integuments of the enamel surface of the teeth. *Br Dent J.* 115: 65–68.
- 16 De Moraes MDR, Carneiro JRM, Passos VF & Santiago SL (2016). Effect of green tea as a protective measure against dental erosion in coronary dentine. *Braz Oral Res.* 30.
- 17 Delius J, Trautmann S, Médard G, Kuster B, Hannig M & Hofmann T (2017). Label-free quantitative proteome analysis of the surface-bound salivary pellicle. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 152: 68–76.
- 18 Doel JJ, Hector MP, Amirtham CV, Al-Anzan LA, Benjamin N & Allaker RP (2004). Protective effect of salivary nitrate and microbial nitrate reductase activity against caries. *Eur J Oral Sci.* 112(5): 424–428.
- 19 Dziejczak SZ & Hudson B (1983). Polyhydroxy chalcones and flavanones as antioxidants for edible oils. *Food Chem.* 12(3): 205–212.
- 20 Eccles JD (1979). Dental erosion of nonindustrial origin. A clinical survey and classification. *J Prosthet Dent.* 42(6): 649–653.
- 21 Esser M, Marx R & Tinschert J (1998). Materialkennwerte der Zahnhartsubstanz des Rindes im Vergleich zur humanen Zahnhartsubstanz. *Dtsch Zahnärztliche Ztg:* 713–717.
- 22 Faria A, Calhau C, de Freitas V & Mateus N (2006). Procyanidins as Antioxidants and Tumor Cell Growth Modulators. *J Agric Food Chem.* 54(6): 2392–2397.
- 23 Featherstone JDB & Lussi A (2006). Understanding the Chemistry of Dental Erosion. *Dent Eros.* 20: 66–76.
- 24 Frank RM & Brendel A (1966). Ultrastructure of the approximal dental plaque and the underlying normal and carious enamel. *Arch Oral Biol.* 11(9): 883–912.
- 25 Frankenberger R & Tay FR (2005). Self-etch vs etch-and-rinse adhesives: effect of thermo-mechanical fatigue loading on marginal quality of bonded resin composite restorations. *Dent Mater.* 21(5): 397–412.
- 26 Gibbons RJ & van Houte J (1975). Dental caries. *Annu Rev Med.* 26: 121–136.
- 27 Gibbons RJ, Moreno EC & Spinell DM (1976). Model delineating the effects of a salivary pellicle on the adsorption of *Streptococcus mitis* onto hydroxyapatite. *Infect Immun.* 14(4): 1109–1112.
- 28 Guo Q, Zhao B, Li M, Shen S & Xin W (1996). Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochim Biophys Acta.* 1304(3): 210–222.

- 29 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(5): 444–449.
- 30 Hannig C., Berndt D, Hoth-Hannig W & Hannig M (2009). The effect of acidic beverages on the ultrastructure of the acquired pellicle—An in situ study. *Arch Oral Biol.* 54(6): 518–526.
- 31 Hannig C., Hamkens A, Becker K, Attin R & Attin T (2005a). Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. *Arch Oral Biol.* 50(6): 541–552.
- 32 Hannig C., Hannig M. M & Attin T (2005b). Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci.* 113(1): 2–13.
- 33 Hannig C., Spitzmüller B, Al-Ahmad A & Hannig M (2008a). Effects of Cistus-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the in situ pellicle. *J Dent.* 36(7): 540–545.
- 34 Hannig C., Spitzmüller B, Miller M, Hellwig E & Hannig M (2008b). Intrinsic enzymatic crosslinking and maturation of the in situ pellicle. *Arch Oral Biol.* 53(5): 416–422.
- 35 Hannig M. (2002). The protective nature of the salivary pellicle. *Int Dent J.* 52(S5): 417–423.
- 36 Hannig M. (1997). Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. *Eur J Oral Sci.* 105(5 Pt 1): 422–433.
- 37 Hannig M. (1999). Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig.* 3(2): 88–95.
- 38 Hannig M. & Balz M (1999). Influence of in vivo Formed Salivary Pellicle on Enamel Erosion. *Caries Res.* 33(5): 372–379.
- 39 Hannig M. & Balz M (2001). Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Res.* 35(2): 142–148.
- 40 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(11): 903–910.
- 41 Hannig M. & Hannig C. (2007). Der initiale orale Biofilm – pathogen oder protektiv? *Oralprophylaxe.* 29: 73-82
- 42 Hannig M. & Hannig C. (2014). The pellicle and erosion. *Monogr Oral Sci.* 25: 206–214.
- 43 Hannig M., Hess NJ, Hoth-Hannig W & Vrese M de (2003). Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization – an in situ pilot study. *Clin Oral Investig.* 7(3): 158–161.

- 44 Hannig M. & Joiner A (2006). The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci.* 19: 29–64.
- 45 Hay DI (1969). Some Observations on Human Saliva Proteins and their Role in the Formation of the Acquired Enamel Pellicle. *J Dent Res.* 48(5): 806–810.
- 46 Hay DI (1973). The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. *Arch Oral Biol.* 18(12): 1517–1529.
- 47 Hertel S, Pötschke S, Basche S, *et al.* (2017). Effect of Tannic Acid on the Protective Properties of the in situ Formed Pellicle. *Caries Res.* 51(1): 34–45.
- 48 Ikigai H, Nakae T, Hara Y & Shimamura T (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 1147(1): 132–136.
- 49 Inaba H, Tagashira M, Kanda T, Ohno T, Kawai S & Amano A (2005). Apple- and Hop-Polyphenols Protect Periodontal Ligament Cells Stimulated With Enamel Matrix Derivative From *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol.* 76(12): 2223–2229.
- 50 Ionta FQ, de Alencar CRB, Val PP (2017). Effect of vegetable oils applied over acquired enamel pellicle on initial erosion. *J Appl Oral Sci* 25(4): 420–426.
- 51 Ishtikhar M, Ahmad E, Siddiqui Z, *et al.* (2018). Biophysical insight into the interaction mechanism of plant derived polyphenolic compound tannic acid with homologous mammalian serum albumins. *Int J Biol Macromol.* 107(Pt B): 2450–2464.
- 52 Ishtikhar M, Khan A, Chang C-K, Lin LT-W, Wang SS-S & Khan RH (2016). Effect of guanidine hydrochloride and urea on the interaction of 6-thioguanine with human serum albumin: a spectroscopic and molecular dynamics based study. *J Biomol Struct Dyn.* 34(7): 1409–1420.
- 53 Jaeggi T & Lussi A (2006). Prevalence, Incidence and Distribution of Erosion. *Monogr Oral Sci.* 20: 44–65.
- 54 Jarvinen VK, Rytomaa II & Heinonen OP (1991). Risk Factors in Dental Erosion. *J Dent Res.* 70(6): 942–947.
- 55 Jensen JL, Lamkin MS & Oppenheim FG (1992). Adsorption of Human Salivary Proteins to Hydroxyapatite: A Comparison Between Whole Saliva and Glandular Salivary Secretions. *J Dent Res.* 71(9): 1569–1576.
- 56 Johansson A-K, Omar R, Carlsson GE & Johansson A (2012). Dental Erosion and Its Growing Importance in Clinical Practice: From Past to Present. *Int J Dent.* 2012.
- 57 Joiner A, Muller D, Elofsson UM & Arnebrant T (2004). Ellipsometry analysis of the in vitro adsorption of tea polyphenols onto salivary pellicles. *Eur J Oral Sci.* 112(6): 510–515.
- 58 Kensche A, Kirsch J, Mintert S, *et al.* (2017). Impact of customary fluoride rinsing solutions on the pellicle's protective properties and bioadhesion in situ. *Sci Rep.* 7(1): 16584.

- 59 Kensch A, Reich M, Kümmerer K, Hannig M & Hannig C (2013). Lipids in preventive dentistry. *Clin Oral Investig.* 17(3): 669–685.
- 60 Khanbabaee K & Ree T van (2001). Tannins: Classification and Definition. *Nat Prod Rep.* 18(6): 641–649.
- 61 Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, *et al.* (2016). The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J.* 221(10): 657–666.
- 62 Kobus-Cisowska J, Szymanowska-Powalowska D, Szczepaniak O, *et al.* (2019). Composition and In Vitro Effects of Cultivars of *Humulus lupulus* L. Hops on Cholinesterase Activity and Microbial Growth. *Nutrients.* 11(6): 1377.
- 63 Kolečkar V, Kubikova K, Rehakova Z, Kuca K, Jun D, Jahodar L. & Opletal L (2008). Condensed and Hydrolysable Tannins as Antioxidants Influencing the Health. *Mini-Rev Med Chem.* 8(5): 436-447.
- 64 Lasswell WL, Weber SS & Wilkins JM (1984). In vitro interaction of neuroleptics and tricyclic antidepressants with coffee, tea, and gallotannic acid. *J Pharm Sci.* 73(8): 1056–1058.
- 65 Leach SA & Saxton CA (1966). An electron microscopic study of the acquired pellicle and plaque formed on the enamel of human incisors. *Arch Oral Biol.* 11(11): 1081–1094.
- 66 Lee Y, N Zimmerman J, Custodio W, *et al.* (2013). Proteomic Evaluation of Acquired Enamel Pellicle during In Vivo Formation. *PloS One.* 8(7): e67919.
- 67 Lendenmann U, Grogan J & Oppenheim FG (2000). Saliva and Dental Pellicle-A Review. *Adv Dent Res.* 14(1): 22–28.
- 68 Li Y-H & Tian X (2012). Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. *Sensors.* 12(3): 2519–2538.
- 69 Lussi A & Carvalho TS (2015). The future of fluorides and other protective agents in erosion prevention. *Caries Res.* 49 Suppl 1: 18–29.
- 70 Lussi A, Jaeggi T & Schaffner M (2002). Diet and dental erosion. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 18(9): 780–781.
- 71 Lussi A, Jaeggi T & Zero D (2004). The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res.* 38 Suppl 1: 34–44.
- 72 Manabe A, Nakayama S & Sakamoto K (1987). Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalmitoyl phosphatidylcholine-liposomes. *Jpn J Pharmacol.* 44(1): 77–84.
- 73 Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C & Jiménez L (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79(5): 727–747.

- 74 Manarelli MM, Pessan JP, Delbem ACB, Amaral JG, Paiva MF & Barbour ME (2017). Protective Effect of Phosphates and Fluoride on the Dissolution of Hydroxyapatite and Their Interactions with Saliva. *Caries Res.* 51(2): 96–101.
- 75 Marchese A, Orhan IE, Daglia M, *et al.* (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chem.* 210: 402–414.
- 76 Mayhall CW & Butler WT (1976). The carbohydrate composition of experimental salivary pellicles. *J Oral Pathol Med.* 5(6): 358–370.
- 77 Meckel AH (1965). The formation and properties of organic films on teeth - ScienceDirect. *Arch Oral Biol.* 10(4): 585–597.
- 78 Meckel AH (1968). The Nature and Importance of Organic Deposits on Dental Enamel. *Caries Res.* 2(2): 104–114.
- 79 Mendes SS, Bomfim RR, Jesus HCR, *et al.* (2010). Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *J Ethnopharmacol.* 129(3): 391–397.
- 80 Murakami C, Hirakawa Y, Inui H, Nakano Y & Yoshida H (2002). Effect of Tea Catechins on Cellular Lipid Peroxidation and Cytotoxicity in HepG2 Cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66(7): 1559–1562.
- 81 Murakami Y, Nagata H, Amano A, *et al.* (1991). Inhibitory effects of human salivary histatins and lysozyme on coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mitis*. *Infect Immun.* 59(9): 3284–3286.
- 82 Myburgh KH (2014). Polyphenol Supplementation: Benefits for Exercise Performance or Oxidative Stress? *Sports Med.* 44(1): 57–70.
- 83 Nasmyth A (1839). On the structure, physiology, and pathology of the persistent capsular investments and pulp of the tooth. *Medico-Chir Trans.* 22: 310–328.
- 84 Niemetz R & Gross GG (2005). Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry.* 66(17): 2001–2011.
- 85 Oesterle LJ, Shellhart WC & Belanger GK (1998). The use of bovine enamel in bonding studies. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 114(5): 514–519.
- 86 Ortiz-Ruiz AJ, de Dios Teruel-Fernández J, Alcolea-Rubio LA, Hernández-Fernández A, Martínez-Beneyto Y & Gispert-Guirado F (2018). Structural differences in enamel and dentin in human, bovine, porcine, and ovine teeth. *Ann Anat Anat Anz.* 218: 7–17.
- 87 Pelvan E, Olgun EÖ, Karadağ A & Alasalvar C (2018). Phenolic profiles and antioxidant activity of Turkish Tombul hazelnut samples (natural, roasted, and roasted hazelnut skin). *Food Chem.* 244(Supplement C): 102–108.
- 88 Pérez-Sánchez A, Borrás-Linares I, Barrajon-Catalán E, *et al.* (2017). Evaluation of the intestinal permeability of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract polyphenols and terpenoids in Caco-2 cell monolayers. *PloS One.* 12(2): e0172063.

- 89 Pilna J, Vlkova E, Krofta K, Nesvadba V, Rada V & Kokoska L (2015). In vitro growth-inhibitory effect of ethanol GRAS plant and supercritical CO₂ hop extracts on planktonic cultures of oral pathogenic microorganisms. *Fitoterapia*. 105: 260–268.
- 90 Pollock JJ, Denepitiya L, MacKay BJ & Iacono VJ (1984). Fungistatic and fungicidal activity of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Candida albicans*. *Infect Immun*. 44(3): 702–707.
- 91 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(Supplement C): 21–29.
- 92 Reich M, Kümmerer K, Al-Ahmad A & Hannig C (2013). Fatty acid profile of the initial oral biofilm (pellicle): an in-situ study. *Lipids*. 48(9): 929–937.
- 93 Roufegarinejad L, Jahanban-Esfahlan A, Sajed-Amin S, Panahi-Azar V & Tabibiazar M (2018). Molecular interactions of thymol with bovine serum albumin: Spectroscopic and molecular docking studies. *J Mol Recognit*. 31(7): e2704
- 94 Rüdiger SG, Carlén A, Meurman JH, Kari K & Olsson J (2002). Dental biofilms at healthy and inflamed gingival margins. *J Clin Periodontol*. 29(6): 524–530.
- 95 Salaheen S, Almario JA & Biswas D (2014). Inhibition of growth and alteration of host cell interactions of *Pasteurella multocida* with natural byproducts. *Poult Sci*. 93(6): 1375–1382.
- 96 Salton MRJ (1957). The Properties of Lysozym and its action on Microorganisms. *Bacteriol Rev*. 21(2): 82–100.
- 97 Sánchez-Carranza JN, Alvarez L, Marquina-Bahena S, *et al.* (2017). Phenolic Compounds Isolated from *Caesalpinia coriaria* Induce S and G2/M Phase Cell Cycle Arrest Differentially and Trigger Cell Death by Interfering with Microtubule Dynamics in Cancer Cell Lines. *Molecules*. 22(4): 666.
- 98 Saravanan S & Pari L (2015). Role of thymol on hyperglycemia and hyperlipidemia in high fat diet-induced type 2 diabetic C57BL/6J mice. *Eur J Pharmacol*. 761: 279–287
- 99 Scannapieco FA (1994). Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol*. 5(3–4): 203–248.
- 100 Schött G, Liesegang S, Gaunitz F, *et al.* (2017). The chemical composition of the pharmacologically active *Thymus* species, its antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and the antiadherent effects of *T. vulgaris* on the bacterial colonization of the in situ pellicle. *Fitoterapia*. 121: 118–128.
- 101 Shahidi F, Janitha PK & Wanasundara PD (1992). Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 32(1): 67–103.
- 102 Shanafelt TD, Lee YK, Call TG, *et al.* (2006). Clinical effects of oral green tea extracts in four patients with low grade B-cell malignancies. *Leuk Res*. 30(6): 707–712.

- 103 Shinada K, Tagashira M, Watanabe H, *et al.* (2007). Hop Bract Polyphenols Reduced Three-day Dental Plaque Regrowth. *J Dent Res.* 86(9): 848–851.
- 104 Siqueira WL, Bakkal M, Xiao Y, Sutton JN & Mendes FM (2012a). Quantitative Proteomic Analysis of the Effect of Fluoride on the Acquired Enamel Pellicle. *PLoS ONE.* 7(8): e42204
- 105 Siqueira WL, Custodio W & McDonald EE (2012b). New Insights into the Composition and Functions of the Acquired Enamel Pellicle. *J Dent Res.* 91(12): 1110–1118.
- 106 Siqueira WL, Margolis HC, Helmerhorst EJ, Mendes FM & Oppenheim FG (2010). Evidence of Intact Histatins in the *in vivo* Acquired Enamel Pellicle. *J Dent Res.* 89(6): 626–630.
- 107 Skjørland KK, Rykke M & Sønju T (1995). Rate of pellicle formation *in vivo*. *Acta Odontol Scand.* 53(6): 358–362.
- 108 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(3): 187–191.
- 109 Soares S, Vitorino R, Osório H, *et al.* (2011). Reactivity of Human Salivary Proteins Families Toward Food Polyphenols. *J Agric Food Chem.* 59(10): 5535–5547.
- 110 de Souza-e-Silva CM, da Silva Ventura TM, de Pau L, da Silva Cassiano, de Lima Leite A & Buzalaf MAR (2017). Effect of gels containing chlorhexidine or epigallocatechin-3-gallate on the protein composition of the acquired enamel pellicle. *Arch Oral Biol.* 82(Supplement C): 92–98.
- 111 Suzuki Y, Nakamura S, Sugiyama K & Furuta H (1987). Differences of superoxide production in blood leukocytes stimulated with thymol between human and non-human primates. *Life Sci.* 41(13): 1659–1664.
- 112 Svendsen IE, Lindh L, Arnebrant T (2006). Adsorption behaviour and surfactant elution of cationic salivary proteins at solid/liquid interfaces, studied by *in situ* ellipsometry *Colloids Surf. B* 53(2): 157-166
- 113 Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID & Ellison SA (1982). Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol.* 11(1): 1–17.
- 114 Tanaka Y, Yanagida A, Komeya S, *et al.* (2014). Comprehensive Separation and Structural Analyses of Polyphenols and Related Compounds from Bracts of Hops (*Humulus lupulus* L.). *J Agric Food Chem.* 62(10): 2198–2206.
- 115 Theilade E, Wright WH, Jensen SB & Løe H (1966). Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontal Res.* 1: 1–13.
- 116 Thomas EL, Pera KA, Smith KW & Chwang AK (1983). Inhibition of *Streptococcus mutans* by the lactoperoxidase antimicrobial system. *Infect Immun.* 39(2): 767–778.

- 117 Tipoe GL, Leung T-M & Hung M-W & Fung M-L (2007). Green Tea Polyphenols as an Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Agent for Cardiovascular Protection. *Cardiovasc Hematol Disord-Drug Targets*. 7(2): 135-144
- 118 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(4): 332–336.
- 119 Ullmann U, Haller J, Decourt JP, *et al.* (2003). A single ascending dose study of epigallocatechin gallate in healthy volunteers. *J Int Med Res*. 31(2): 88–101.
- 120 Vacca Smith AM & Bowen WH (2000). In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol*. 45(4): 277–291.
- 121 Vázquez Loureiro P, Hernández Jiménez I, Sendón R, Rodríguez-Bernaldo de Quirós A & Barbosa-Pereira L (2019). Determination of Xanthohumol in Hops, Food Supplements and Beers by HPLC. *Foods*. 8(10): 435.
- 122 Wang YB & Germaine GR (1991). Effect of lysozyme on glucose fermentation, cytoplasmic pH, and intracellular potassium concentrations in *Streptococcus mutans* 10449. *Infect Immun*. 59(2): 638–644.
- 123 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(5): 477–87.
- 124 Wei S, Sun T, Du J, Zhang B, Xiang D & Li W. (2018). Xanthohumol, a prenylated flavonoid from Hops, exerts anticancer effects against gastric cancer in vitro. *Oncol Rep*. 40(6): 3213–3222.
- 125 Wiegand A, Bliggenstorfer S, Magalhaes AC, Sener B & Attin T (2008). Impact of the in situ formed salivary pellicle on enamel and dentine erosion induced by different acids. *Acta Odontol Scand*. 66(4): 225–230.
- 126 Williams RC & Gibbons RJ (1972). Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. *Science*. 177(4050): 697–699.
- 127 Yang C, Wang M, Zhou J & Chi Q (2017). Bio-synthesis of peppermint leaf extract polyphenols capped nano-platinum and their in-vitro cytotoxicity towards colon cancer cell lines (HCT 116). *Mater Sci Eng C*. 77(Supplement C): 1012–1016.
- 128 Yuan J-H, Li Y-Q & Yang X-Y (2007). Inhibition of Epigallocatechin Gallate on Orthotopic Colon Cancer by Upregulating the Nrf2-UGT1A Signal Pathway in Nude Mice. *Pharmacology*. 80(4): 269–278.
- 129 Zahradnik RT, Moreno EC & Burke EJ (1976). Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. *J Dent Res*. 55(4): 664–670.
- 130 Zahradnik RT, Propas D & Moreno EC (1977). In vitro enamel demineralization by *Streptococcus mutans* in the presence of salivary pellicles. *J Dent Res*. 56(9): 1107–1110.

- 131 Zanolì P, Rivasi M, Zavatti M, Brusiani F & Baraldi M (2005). New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol.* 102(1): 102–106.
- 132 Zanolì P & Zavatti M (2008). Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol.* 116(3): 383–396.
- 133 Zee KY, Samaranayake LP & Attström R (1996). Predominant cultivable supragingival plaque in Chinese “rapid” and “slow” plaque formers. *J Clin Periodontol.* 23(11): 1025–1031.
- 134 Zeng Q, Zheng L, Zhou J, Xiao H, Zheng J & Zhou Z (2017). Effect of alcohol stimulation on salivary pellicle formation on human tooth enamel surface and its lubricating performance. *J Mech Behav Biomed Mater.* 75(Supplement C): 567–573.
- 135 Zhang YF, Zheng J, Zheng L & Zhou ZR (2015). Effect of adsorption time on the adhesion strength between salivary pellicle and human tooth enamel. *J Mech Behav Biomed Mater.* 42(Supplement C): 257–266

7. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle sehr gerne die Gelegenheit nutzen, den Menschen zu danken, welche mich bei der Erstellung meiner Dissertation in großem Maße unterstützt haben.

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Professor Dr. Matthias Hannig, Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und präventive Zahnheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die freundliche Betreuung und die konstruktiven Hinweise zur Verbesserung der Dissertation.

Bedanken möchte ich mich auch bei den wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern. Durch ihre Hilfe bei der Durchführung der Versuchsreihen im Labor und durch ihre Erfahrungen sowie die tolle Arbeit am Raster- und Transmissionselektronenmikroskop haben sie mir sehr geholfen diese Dissertation zu erstellen.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich sehr für den Zuspruch, das Korrekturlesen und die fortwährende Unterstützung. Ein besonderer Dank richtet sich hier an meine Eltern.

Vielen Dank.

8. Lebenslauf

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