



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

Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

***In-vitro*-Studie zur tubulusokkludierenden Wirkung  
von nano-Hydroxylapatit Suspensionen und Fluoridpräparaten  
sowie deren Kombinationen**

*Dissertation zur Erlangung eines Doktorgrades der Zahnheilkunde*

*der medizinischen Fakultät*

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von

Andreas Graß

geb. am 25.07.1965 in Wanne-Eickel

# Inhalt

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Zusammenfassung .....  | 1  |
| 1.1   | Deutsche Zusammenfassung .....   | 1  |
| 1.2   | Summary.....   | 3  |
| 2     | Einleitung .....   | 4  |
| 2.1   | Dentinhypersensibilität.....   | 6  |
| 2.1.1 | Dentinaufbau .....   | 6  |
| 2.1.2 | Ätiologie.....   | 7  |
| 2.1.3 | Epidemiologie .....  | 8  |
| 2.1.4 | Therapie.....  | 9  |
| 2.2   | Literaturübersicht.....  | 10 |
| 2.2.1 | Hydroxylapatit, nano-Hydroxylapatit und Fluoride.....                          | 10 |
| 2.2.2 | Remineralisierende Wirkung.....  | 11 |
| 2.2.3 | Tubulusokkludierende Wirkstoffe.....   | 13 |
| 2.2.4 | Klinische Anwendungen .....  | 19 |
| 2.3   | Ziel der Arbeit und Fragestellung.....   | 22 |
| 3     | Material und Methode .....   | 23 |
| 3.1   | Herstellung der Prüfkörper .....   | 23 |
| 3.2   | Applikation experimenteller Mischungen von nano-Hydroxylapatit, Vorversuche .. | 25 |
| 3.3   | Lichtmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie.....                          | 26 |
| 4     | Hauptversuch.....  | 28 |
| 4.1   | Gruppeneinteilung Hauptversuch .....   | 28 |
| 4.1.1 | Rasterelektronenmikroskopie und Elementanalyse .....                           | 30 |
| 5     | Ergebnisse .....   | 33 |
| 5.1   | Vorversuch.....  | 33 |
| 5.1.1 | Lichtmikroskopie .....   | 33 |
| 5.1.2 | Rasterelektronenmikroskopie.....   | 39 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 5.2   | Hauptversuch .....  | 41 |
| 5.2.1 | Qualitative Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung ....      | 41 |
| 5.2.2 | Ergebnisse der Elementanalyse .....   | 49 |
| 6     | Diskussion .....  | 55 |
| 6.1   | Prüfkörper .....  | 55 |
| 6.2   | Applikation und Lagerung .....  | 58 |
| 6.3   | Kritische Betrachtung der Untersuchungsmethoden .....                             | 60 |
| 6.4   | Wirkungen der Agenzien auf der nicht geätzten Fläche.....                         | 62 |
| 6.5   | Wirkungen der Agenzien auf eröffnete Dentintubuli und konditioniertes Dentin .... | 63 |
| 7     | Schlussfolgerung .....  | 66 |
| 8     | Literatur .....   | 68 |
| 9     | Anhang .....  | 74 |
| 10    | Lebenslauf .....  | 75 |
| 11    | Danksagung .....  | 76 |

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutsche Zusammenfassung

Zahnüberempfindlichkeiten sind ein häufig auftretendes Problem in der zahnärztlichen Praxis. Ursächlich dafür sind meistens freiliegende zervikale Dentinbereiche. Mit der Verbesserung parodontaler und restaurativer Therapien sowie dem Einfluss erosiver Nahrungsmittel ist mit einer weiteren Zunahme von Hypersensibilitäten zu rechnen. Nach derzeitiger Auffassung führen freiliegende Wurzeloberflächen durch Rezessionen oder parodontale Therapien und Schmelzverluste an der Schmelz-Zement-Grenze zu freiliegenden Dentinflächen und eröffneten Dentintubuli. Freiliegende Dentintubuli sind nach der hydrodynamischen Theorie von Brännström die Ursache für Überempfindlichkeiten. Desensibilisierende Mittel sollen zum Verschluss freiliegender Tubuli führen. *In vitro* wurden desensibilisierende Agenzien bisher an senkrecht zur Zahnachse präparierten, humanen Dentinscheiben oder an Scheiben von Rinderinzisiven untersucht. Bei beiden Modellen bleibt der für die Entstehung von Hypersensibilitäten relevante Dentinbereich unberücksichtigt. In der vorgelegten Untersuchung wurde, abweichend von den bisherigen Verfahren, eine Präparationsart zur Freilegung von zervikalem Dentin mit eröffneten Tubuli etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass das gewählte Modell geeignet ist, die für die Entstehung von Dentinhypersensibilitäten relevanten Bereiche darzustellen.

Eine Vielzahl von chemischen Agenzien wird kombiniert oder als Monopräparat zur Behandlung überempfindlicher Zähne klinisch eingesetzt, von denen sich aber keines als Goldstandard etablieren konnte. Zu den bereits angewendeten Agenzien gehören Hydroxylapatite, die als Bestandteil der Zahnhartsubstanzen als biomimetisches Mittel gelten. Hauptsächlich kommen sie in Zahncremes in der häuslichen Pflege zur Anwendung. In der zahnärztlichen Praxis hat sich bisher keine geeignete Therapieform durchsetzen können, die den Anforderungen an einfache Applikation, schnellem Wirkeintritt und Wirtschaftlichkeit entsprechen. Hochkonzentrierte fluoridhaltige Präparate gelten als etabliertes Mittel der Kariesprophylaxe und werden als Lacke oder Fluids in verschiedenen Applikationsformen in der zahnärztlichen Praxis angewendet. Hydroxylapatite in der Nanoform und Kombinationen mit fluoridhaltigen Mitteln sind in der topischen Applikation bisher unberücksichtigt geblieben. Daher sollte in der vorgelegten Untersuchung die Wirkung von nano-Hydroxylapatit in wässriger Suspension und in der Kombination mit elmex fluid auf freiliegendes Dentin der Zahnhalsregion untersucht werden.

Die wässrige Suspension von nano-Hydroxylapatit und die Mischung von nano-Hydroxylapatit mit elmex fluid führten zu einer oberflächlichen Auflagerung auf einer geätzten Dentinfläche und Einlagerungen in die Dentintubuli. In der Elementanalyse waren intratubulär höhere Calcium- und Phosphoranteile als auf der intertubulären Fläche messbar. Es kann vermutet werden, dass bereits eine einmalige Applikation zu einem Eindringen von nano-Hydroxylapatit in eröffnete Dentintubuli führt. In der Elementanalyse war ein höherer Fluoranteil in der Mischung mit elmex fluid bei einem ähnlichen Calcium-Phosphor-Verhältnis feststellbar. Das Fluor nimmt bei dem gewählten Versuchsaufbau keinen negativen Einfluss auf die Tubulusokklusion. Dadurch wäre die Kombination von Aminfluorid mit nano-Hydroxylapatit eine denkbare klinische Anwendung.

Neben der desensibilisierenden Wirkung müssen Präparate in der Mundhygiene weitere Anforderungen erfüllen. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Kombination eines hochkonzentrierten Fluoridpräparates mit nano-Hydroxylapatit zu Einlagerungen in die Dentintubuli führt und das Potenzial zur Therapie von Hypersensibilitäten besitzt. Der Nachweis der Stabilität der Verschlüsse in oralem Milieu erfordert weitere Untersuchungen. Daneben müssen Mundpflegeprodukte weitere Aufgaben wie Kariesprophylaxe und Erosionsschutz erfüllen. Die vorgelegte Untersuchung kann dazu als Basis dienen. Es konnte gezeigt werden, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen experimentelle Mischungen von nano-Hydroxylapatit eine Wirkung auf freiliegendes Dentin und eröffnete Dentintubuli der Schmelz-Zement-Grenze besitzen.

## 1.2 Summary

Dentin hypersensitivity is a common condition among patients. There are many etiologic factors related to dentin hypersensitivity. The improvement of periodontal and restorative treatment and the impact of erosive acids may lead to a higher prevalence. The current opinion suggests that the denudation of the root surface with loss of the overlying cementum and the removal of enamel create an exposure of cervical dentin to the oral environment. Based on Brännström's Hydrodynamic Theory, the exposure of the dentine surface and, therefore, the presence of open dentinal tubules, may be a prerequisite for dentin hypersensitivity.

Based on this theory, one of the main strategies to treat this condition consists of the sealing of dentinal tubules by desensitizing agents. The *in vitro* evaluation of desensitizing agents is mostly based on a dentin disc model, wherein thin slices of coronal dentin from extracted human third molars or bovine incisors were prepared perpendicularly to the axis of the tooth. In both models the relevant cervical area remained unconsidered. For the first time we used a model to create opened dentin tubules of the cervical area of extracted human third molars to examine the efficiency of potential desensitizing agents. We could show that this model is reasonable for the examination of desensitizing agents.

There is currently a large number of commercially available desensitizing agents, but at present it is difficult to select one as the so-called gold standard. Hydroxyapatite as a biomimetic agent is mostly used in dentifrices for daily dental care and it has been suggested that there is a high potential in the treatment of hypersensitive teeth. Among the in-office treatment options there is none, which can meet the requirements of easy application, rapid response and efficiency. Varnishes containing high fluoride concentrations are widely used products for the treatment of hypersensitivity and in caries prophylaxis. Hydroxyapatite in nano formulation and a combination product of nano hydroxyapatite with high fluoride agents are currently not taken into consideration in any topical application modus. In the present study we examined the effect on the dentin of the cervical area of an experimental water slurry with nano-hydroxyapatite and the mixture of an established fluorid varnish (elmex fluid) with nano-hydroxyapatite.

We could show that a water slurry of nano-hydroxyapatite and the mixture of elmex fluid with nano-hydroxyapatite lead to surface deposits on the etched dentin surface and penetration into opened dentin tubules. The elemental analysis showed a higher concentration of calcium and phosphor in the examined innertubular area than on the intertubular dentin. It can be assumed that a one-time application of nano-hydroxyapatite leads to a penetration into opened dentin tubules.

Presumably, the application of the mixture of elmex fluid with nano-hydroxyapatite leads to a higher fluor proportion and a similar calcium-phosphor relation. The conclusion was that fluor does not have any negative effect on the occlusion of the dentin tubules under the chosen experimental conditions. It

can be assumed that a combination of nano-hydroxyapatite with fluoride varnishes offers clinical application opportunities.

In addition to desensitizing effects products of oral care must meet more demands. The results show that a combination of highly concentrated fluorid varnish with nano-hydroxyapatite leads to an occlusion of dentin tubule and, therefore, there is a potential in desensitizing therapy. Products of oral care shall fulfil requirements to caries prophylaxis and erosion protection. This *in vitro* study can serve as a basis for further studies to examine the stability of the occlusion under oral conditions.

We could show that experimental mixtures of nano-hydroxyapatite have an impact on exposed dentin of the cervical region and opened dentin tubules.

## 2 Einleitung

Eines der häufigsten Beschwerdebilder in der zahnärztlichen Praxis ist die Überempfindlichkeit von Zähnen. Als Ursache für Dentinhypersensibilitäten werden freiliegende Dentinbereiche und dabei eröffnete Dentintubuli angegeben. Bei jüngeren Patienten werden erosive Defekte für freiliegendes Dentin an der Schmelz-Zement-Grenze verantwortlich gemacht. Bei älteren führen gingivale Veränderung in Folge parodontaler Erkrankungen und Therapien zur Freilegung von Wurzel dentin. Durch Verbesserungen zahnerhaltender Maßnahmen und parodontaler Therapien ist mit einer Zunahme dieser Problematik zu rechnen (Splieth und Tachou, 2013). Übertriebenes Putzen und abrasive Zahncremes gelten als mitbeeinflussende Faktoren.

Die Patienten mit Dentinhypersensibilität reagieren auf chemische, thermische, taktile oder andere Reize mit starken, kurz auftretenden Schmerzen, die keiner anderen Form von Zahndefekten oder Erkrankungen ursächlich zuzuordnen sind (Holland *et al.*, 1997). Die Überempfindlichkeit kann, abhängig von der empfundenen Intensität, als nur gering beeinträchtigend empfunden werden oder bis hin zur erheblichen Einschränkung der Lebensqualität führen. Die Patienten meiden dann schmerzverursachende Lebensmittel oder eine ausreichende Mundhygiene. Die Folge sind Plaqueauflagerungen mit erhöhtem Risiko zur Entstehung parodontaler Erkrankungen oder kariöser Läsionen. Daher sollte eine dauerhafte und effektive Behandlung der Dentinhypersensibilität erfolgen.

Hinsichtlich der Schmerzgenese bei Zahnüberempfindlichkeit gibt es unterschiedliche Theorien. Weitgehende Anerkennung erfährt die hydrodynamische Theorie. Nach ihr werden die Schmerzen durch Bewegungen des Tubulusinhaltes ausgelöst (Brännström und Aström, 1964). Es gibt eine Vielzahl von untersuchten Methoden und Mitteln, die zu einer Linderung des Beschwerdebildes führen sollen. Dabei zu unterscheiden sind die in der zahnärztlichen Praxis anwendbaren Präparate und diejenigen, die Patienten selber anwenden. Bei den meisten therapeutischen Methoden sollen die eröffneten Dentintubuli verschlossen oder eine Veränderung der sensorischen Aktivität der Pulpa erreicht werden.



Eine Schädigung der Pulpa ist dabei zu vermeiden. Gewünscht ist eine schmerzfreie, schnell einsetzende und dauerhafte Wirkung. Nebenwirkungen, wie Verfärbungen und Schädigung der umgebenden Weichgewebe, sollen vermieden werden (Bartold, 2006). Zu den in der zahnärztlichen Praxis etablierten Produkten gehören hochkonzentrierte Fluoridverbindungen in Lacken und Fluids.

Weitere untersuchte und bereits angewandte Stoffe sind unter anderem Calciumphosphate, Oxalate, Strontium-Salze, Arginin und in neuerer Zeit Hydroxylapatit-Nanopartikel (Arnold *et al.*, 2015).

Hydroxylapatit als natürliche Struktur des Zahnschmelzes und nano-Hydroxylapatit soll ähnliche Wirkungen besitzen. In dieser Arbeit soll die Wirkung von experimentell hergestellten wässrigen nano-Hydroxylapatit-Suspensionen und Mischungen von nano-Hydroxylapatit mit einem kommerziellen Fluoridpräparat auf das Dentin untersucht werden. Dabei sollen Dentin und die Dentinkanäle im für die Entstehung von Überempfindlichkeiten relevanten zervikalen Bereich extrahierter menschlicher Zähne untersucht werden.

## 2.1 Dentinhypersensibilität

### 2.1.1 Dentinaufbau

Das Dentin stellt sich sowohl physiologisch als auch anatomisch als eine komplexe Struktur dar. Dabei spiegeln sich verschiedene Funktionen und spezielle Eigenschaften in der Zusammensetzung des Dentins wider. Das Manteldentin der Zahnkrone erscheint geringer mineralisiert, vermutet wird eine dadurch verbesserte Aufnahme und Ableitung von Druckkräften, um Schmelzschäden zu verhindern (Goldberg *et al.*, 2012). Dentin besteht zu etwa 10% aus Wasser, 20% aus organischer Matrix und einem 70%igen anorganischen Anteil. Der anorganische Anteil wird aus Hydroxylapatitkristalliten gebildet, die in Form und Größe denen des Knochens ähneln. Der organische Anteil besteht aus Typ I Kollagen (fibrillärem Kollagen). Das intertubuläre Dentin besteht zu 90% aus Typ I Kollagen. Die hexagonal angeordneten Fibrillen bilden ein Netzwerk, das von nicht-kollagenen Proteinen bedeckt wird. In die Hohlräume dieses Netzwerkes sind die Hydroxylapatitkristallite eingelagert. Diese Kristallite sind plättchenartig mit einer Länge von 60-70 nm, einer Breite von 20-30 nm und einer Dicke von 3-4 nm (Ortiz-Ruiz *et al.*, 2018). Im Gegensatz dazu sind im Schmelz die Kristallite stäbchenartig hexagonal angeordnet, mit einer Breite von etwa 70 nm und einer Dicke von 30 nm. Die Länge variiert von 100-1000 nm.

Nach der Eruption des Zahnes wird lebenslang Sekundärdentin gebildet. Dabei ist der größte Unterschied zum Primärdentin eine stärkere Ausbildung des s-förmigen Verlaufes der Dentintubuli. Im Gegensatz dazu finden sich im Wurzelndentin dünnere und geradlinig bis gekrümmt verlaufende Tubuli. Die Tubuli verlaufen von der Pulpa bis zur Schmelz-Dentin-Grenze. Jedes Lumen wird von einer Dentinmanschette umgeben, die aus einer hochmineralisierten und kollagenarmen Region von Apatit-Kristallen gebildet wird (Enax und Epple, 2016). Die Dichte der Tubuli wird in der Literatur unterschiedlich angegeben und schwankt zwischen 30.000-40.000/mm<sup>2</sup> bei Farooq *et al.* und 18000-20000/mm<sup>2</sup> bei Goldberg *et al.*, die Angaben zum Tubulusdurchmesser liegen bei 2-4 µm (Farooq *et al.*, 2015, Goldberg *et al.*, 2012).

### 2.1.2 Ätiologie

Freiliegende Dentinflächen und eröffnete Dentintubuli gelten als Ursache für Hypersensibilitäten. Dabei können zwei Prozesse zur Exposition führen, der Verlust von Zahnschmelz oder der Verlust von Wurzelzement und der bedeckenden parodontalen Strukturen (Al-Sabbagh *et al.*, 2004). Bei den freiliegenden Dentinflächen sind daher Wurzelzement und koronales Dentin zu unterscheiden.

Bei Rezessionen der Gingiva oder als Folge parodontaler Therapien frei liegt Wurzelzement. Ursachen für Rezessionen können kieferorthopädische Behandlungen, die Atrophie von dünnen vestibulären Knochenlamellen oder Putztraumata sein. Häufig beeinflussen sich die ätiologischen Faktoren wechselseitig.

Durch Verlust von Zahnschmelz an der Schmelz-Zement-Grenze kommt es zu freiliegenden Dentinflächen an der Zahnkrone. Dabei wird oberflächlich demineralisiertes Hartgewebe (Erosion) bei mechanischer Beanspruchung (Abrasion) abgetragen. Das Zusammenspiel von Erosion und Abrasion gilt in den meisten Fällen als wichtigste Ursache für den Substanzverlust, wobei der Erosion eine dominierende Rolle zugeschrieben wird. Als Ko-Faktoren gelten Malokklusion und Bruxismus, die zu Abfrakturen von Zahnschmelz führen. Der zervikale Bereich ist für die Entstehung von Dentinhypersensibilitäten von entscheidender Bedeutung (West *et al.*, 2013). Die durch Rezessionen freiliegenden Wurzelzementareale und die durch Schmelzdefekte entstandenen, freiliegenden zervikalen Dentinbereiche führen nach der Brännström-Theorie durch eröffnete Dentintubuli zur Schmerzentstehung (Brännström und Aström, 1964). Danach stellen die oberflächlich eröffneten Dentintubuli eine Verbindung zur Pulpa her. Durch äußere Reize ausgelöste Bewegungen des Tubulusinhaltes sollen an pulpalen Zellen mit mechanorezeptorischen Eigenschaften den Schmerz auslösen. Die Autoren zeigten dies in einem *In-vivo*-Versuch an später zu extrahierenden Zähnen. Sie erzeugten Schmelzfrakturen zur Freilegung von Dentinflächen. Die so gewonnenen Flächen wurden über zwei Wochen in zeitlichen Abständen mit saugfähigem Papier getrocknet, mit Kaliumchlorid getränktem Papier belegt oder mittels Luftbläser getrocknet. Danach erfolgte zudem eine mechanische Beanspruchung der freiliegenden Flächen. Die auftretenden Schmerzen wurden dokumentiert und die Zähne nach der Extraktion histologisch untersucht. Die Vermutung war, dass die äußeren Bereiche der Dentintubuli für die Schmerzentstehung mit verantwortlich sind. Die Ergebnisse ließen auf eine Auslösung der Schmerzreize durch die Bewegung des Inhaltes der Dentintubuli schließen. Die Autoren gingen davon aus, dass in der Pulpa Zellen entsprechend der Funktion eines Mechanorezeptors auf die Bewegung der Tubulusflüssigkeit reagieren. Eine alleinige Schmerzauslösung durch Odontoblasten wurde ausgeschlossen, da Schmerzen auch auslösbar waren, wenn die Odontoblastenschicht histologisch nachweisbar nicht mehr intakt war. Es wurde die Vermutung geäußert, dass ein Verschluss der Dentintubuli die Schmerzauslösung verhindern könnte, da durch Kratzen an den freiliegenden Flächen eine schnellere Schmerzauslösung feststellbar war.

Weitere Theorien zur Schmerzentstehung wurden in einer Übersichtsarbeit von Bartold zusammengefasst (Bartold, 2013). Die Transduktionstheorie geht von einer Weiterleitung der Reize durch die Odontoblasten mittels neuronaler Transmitterausschüttung aus. Bisher sind entsprechende Transmitter allerdings nicht nachweisbar. Die neuronale Theorie geht von einer Reizung von Nervenfasern in der Tubulusumgebung aus, was die Wirkung von Kalium-Nitrat erklärt. Die Kalium-Ionen wirken depolarisierend auf Nervenfasern.

Die Patienten geben bei Hypersensibilitäten einen kurzen, starken Schmerz an. Dieser wird durch Berührung, Temperatur (meistens Kälte), osmotisch wirkende Reize (z.B. süß oder salzig), und chemische Reize ausgelöst. Die Ausprägung der Hypersensibilität lässt sich dabei nur schwer messen, der Zahnarzt muss sich auf die Angaben des Patienten verlassen. Die klassischen Kältetests und Luftblasversuche sind nicht in der Lage, alle Formen der Hypersensibilität zu erfassen. Da die Patienten die Dentinhypersensibilitäten in unterschiedlichen Schweregraden empfinden, werden milde Formen dem Behandler teilweise nicht geschildert. Daher soll ein screening von schmerzverursachenden Ereignissen durch eine gezielte Anamnese vorgenommen werden. Die Diagnose kann erst gestellt werden, wenn andere Ursachen ausgeschlossen sind (Türp, 2013).

### 2.1.3 Epidemiologie

Die Zahlen zur Verbreitung der Dentinhypersensibilitäten schwanken in den epidemiologischen Untersuchungen zwischen 3 und 98%, in den meisten zusammenfassenden Arbeiten wird eine Prävalenz von 3 bis 57% angegeben (Splieth und Tachou, 2013). Der Grund für die Schwankungen liegt in der Auswahl der untersuchten Gruppen, im Studiendesign und den unterschiedlichen diagnostischen Kriterien. Es sind mehr Frauen als Männer betroffen. Der Altersgipfel liegt bei den 30-40-jährigen, danach ist eine Abnahme der Verbreitung festzustellen, was auf die fortschreitende Sklerosierung und Sekundärdentinbildung zurückgeführt wird. Allerdings wird durch den wachsenden Erfolg der zahnerhaltenden Maßnahmen mit einer Verschiebung des Altersgipfels gerechnet.

#### 2.1.4 Therapie

Die zahnärztliche Aufgabe ist es, bei bestehender Dentinhypersensibilität die Risikofaktoren für dieses Phänomen zu mindern (Brookfield *et al.*, 2003). Der Patient sollte angehalten werden, säurehaltige Ernährung zu meiden und die Zahnpflege in zeitlichem Abstand zu den Mahlzeiten durchzuführen. Gegebenenfalls sollte er vor dem Essen die Zähne putzen. Außerdem ist auf die Putztechnik zu achten, um Putztraumata zu vermeiden. Bei weiter bestehenden Beschwerden erfolgt die Anwendung von lokal anwendbaren Präparaten oder die Empfehlung von desensibilisierenden Mitteln. Durch die therapeutischen Maßnahmen sollen Dentintubuli verschlossen werden. Ein anderer Ansatz beruht auf der Unterbindung der Reizleitung in der Pulpa (Arnold *et al.*, 2015). Beim Tubulusverschluss kann man unterscheiden in Wirkstoffe, die zu intratubulären Ausfällungen oder die zur Bildung einer aufgelagerten Schicht führen. Allerdings hat sich noch kein Präparat als Goldstandard für den Tubulusverschluss etablieren können (Amaechi *et al.*, 2018).

Die Therapieempfehlungen können weiterhin unterschieden werden in Methoden, die in der Praxis angewandt werden (sogenannte in-office Präparate) oder Mittel der häuslichen Anwendung (Low *et al.*, 2015). Bei den in-office Präparaten können Präparate genutzt werden, die nach Applikation aushärten, wie Glasionomerzemente oder Composite, und solche, die keine Abbindereaktion benötigen, wie Lacke und Oxalate. Außerdem werden in der zahnärztlichen Praxis invasive Verfahren unter Abwägung des zu erwartenden Nutzens angewandt. Dazu zählen die mukogingivale Chirurgie und die Vitalextripation. Mittel in der häuslichen Anwendung benötigen in der Regel keine Abbindereaktionen. Zu ihnen gehören neben Spüllösungen auch Kaugummis und Zahncremes. Am häufigsten werden desensibilisierende Agenzien in Zahncremes angewendet. Neben den Effekten zur Desensibilisierung müssen Zahncremes andere Aufgaben erfüllen. In saurem Milieu soll die kariesprophylaktische Wirkung erhalten bleiben, im Speichel sollen die Wirkstoffe stabil sein und initiale kariöse Läsionen remineralisiert werden.

## 2.2 Literaturübersicht

Freiliegende Dentintubuli gelten nach der hydrodynamischen Theorie als Ursache für die Dentinhy-persensibilität. Daher gilt das Forschungsinteresse dem dauerhaften Verschluss der Dentintubuli. Hier-für werden Ausfällungen durch chemische Reaktionen und chemische Verbindungen genutzt. Davon sind viele nicht Bestandteil des natürlichen Dentins, z.B. Kaliumoxalat und Eisenoxalat. Sie sind zu-dem im Speichel nicht stabil. Weitere Möglichkeiten zum Verschluss von Tubuli liegen in der An-wendung von Lasern.

Die verschiedenen Wirkstoffe sind in einer Meta-Analyse erfasst worden (Bae *et al.*, 2015). Einge-schlossen wurden Studien von 1994-2013, die randomisiert und kontrolliert den Effekt von desensibi-lisierenden Zahncremes untersucht haben. Die ausgewerteten Studien umfassten 2436 Probanden, wobei die Autoren kommerzielle Untersuchungen miteinbezogen haben. Die Wirkstoffe waren Kali-um, Zinnfluorid, Novamin (Calcium-Natrium-Phosphosilikat), Arginin und Calcium-Carbonate sowie Strontium. Es konnten bei allen Studien desensibilisierende Effekte im Vergleich zu Placebo-enthaltenden Cremes festgestellt werden. Die das Strontium enthaltenden Pasten hatten keinen statis-tisch signifikanten desensibilisierenden Effekt.

### 2.2.1 Hydroxylapatit, nano-Hydroxylapatit und Fluoride

Hydroxylapatit (Summenformel:  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) ist das am häufigsten nachzuweisende Mineral in Knochen und Zähnen. Bei neutralem pH hat es die geringste Löslichkeit von allen Calciumphosphaten (Enax und Epple, 2016). Seine Struktur ist hexagonal mit einem Gitterparameter von  $a=9.430 \text{ \AA}$  und  $c=6.892 \text{ \AA}$ . Es ist in seiner reinen Form weißlich und wird kommerziell in verschiedenen Partikelgrö-ßen hergestellt. Die Morphologie reicht von nadelartigen bis zu sphärischen Kristallen. Da die Parti-kelgröße und die Form der Kristalle die Wirkung von hydroxylapatithaltigen Produkten beeinflussen, werden verschiedene Partikelgrößen vom Nano- bis zum Mikrobereich synthetisiert. Hydroxylapatit ist im Gegensatz zu anderen oralen Pflegeprodukten nicht toxisch. Bei niedrigem pH der Magensäure löst sich die kristalline Struktur in die Ionen auf

Die synthetische Herstellung ist chemisch gut erklärt und bietet Möglichkeiten, die Struktur und Größe der Kristalle an verschiedene Erfordernisse anzupassen (Enax und Epple, 2016). Hydroxylapatit kann chemisch an Knochen gebunden werden, ist nicht toxisch oder entzündlich und kann durch direkte Wirkung auf Osteoblasten Knochenwachstum anregen. Daher rührt die verbreitete Anwendung in der parodontalen regenerativen und oralen Chirurgie. Die erstmalige Anwendung von Hydroxylapatit in einer Zahncreme erfolgte 1978 (Apadent, The Sangi Co Ltd.). In Europa ist 2006 erstmalig eine Zahn-creme mit synthetischem Hydroxylapatit auf den Markt gekommen. Wegen der Übereinstimmung mit den Schmelzkristalliten humaner Zähne spricht man von einem biomimetischen Wirkstoff Das synthe-

tisierte Hydroxylapatit soll sich wie ein künstlicher Schmelz auf die Zahnoberfläche legen können (Pepla *et al.*, 2014).

Nano-Hydroxylapatit gilt als biokompatibel und bioaktiv. Die Kristallite können auf der bakteriellen Oberfläche adsorbieren und die Bindung von Bakterien auf Oberflächen stören. Dadurch erfolgte in den vergangenen Jahren eine hohe Akzeptanz in der Medizin und Zahnmedizin. Es wird davon ausgegangen, dass sie im oralen Milieu eine Übersättigung von Calcium und Phosphat auf der Zahnoberfläche aufrechterhalten (Hannig und Hannig, 2010).

Fluoride werden wegen ihres remineralisierenden Effektes in der Zahnprophylaxe genutzt. Sie werden in verschiedenen chemischen Zusammensetzungen in Zahncremes, Spüllösungen oder in-office Präparaten angewandt (Zinnfluoride, Natriumfluoride, Aminfluoride). In der hier vorgelegten *In-vitro*-Studie wird eine 1%ige Fluoridlösung (elmex fluid, Fa. GABA, Hamburg) untersucht. Empfohlen wird zur Kariesprophylaxe die 2-mal jährliche Applikation in der zahnärztlichen Praxis.

### 2.2.2 Remineralisierende Wirkung

In den letzten Jahren ist die remineralisierende Wirkung von Hydroxylapatit auf den Zahnschmelz vielfach untersucht worden. Durch die Synthese von Apatitkristallen gelang es, eine Remineralisation oberflächlicher Schmelzdefekte *in vitro* zu erreichen (Roveri *et al.*, 2009). Da Hydroxylapatitkristalle durch den Kristallisationsgrad im Nanobereich in der Form veränderbar sind, synthetisierten Roveri *et al.* nadelförmige Kristalle von 100 nm in clustern von 0,5-3,0 µm, sowie tellerförmige von 20 nm in granulärer Struktur von 100-150 µm. Sie simulierten Erosionen auf den Approximalflächen extrahierter Prämolaren. Es konnte gezeigt werden, dass die Applikation kleinerer Apatitkristalle zu einer besseren Remineralisation der tieferen Schmelzschichten führt. Auf den erodierten Schmelzarealen bildete sich eine Apatitschicht, die abrasive und erosive Attacken verhinderte. Die Autoren sprachen von einem neuen „biomimetischen mineralcoating“. Im Vergleich dazu ist die Fluoridwirkung durch die Einlagerung von Fluoridionen in die oberflächlichen Schmelzapatite zu erklären und weniger durch die Bildung neuer Mineraldepots.

Eine *In-vitro*-Studie konnte zeigen, dass nano-Hydroxylapatit enthaltende Zahncremes eine bessere remineralisierende Wirkung an Dentin und Schmelz als aminfluoridhaltige Zahncremes besitzen (Tschope *et al.*, 2011). Die remineralisierende Wirkung von nano-Hydroxylapatit wurde dabei an Rinderinzisiven in einer Putzsimulation untersucht. Während des Versuches lagerten die Proben in einer remineralisierenden Lösung. An den Prüfkörpern wurden demineralisierte Defekte in Schmelz und Dentin erzeugt. Die Läsionstiefen und der Mineralverlust wurden gemessen (transverse Mikroradiografie) und der pH-Wert der Lagerungslösung festgehalten. Die untersuchten Zahncremes waren, bis auf die Kontrollgruppe mit Aminfluoriden, fluoridfrei. Bei diesen Proben konnte eine hypermineralisierte Deckschicht festgestellt werden, allerdings war eine Zunahme der Läsionstiefen festzustellen. Im Gegensatz dazu ergab sich bei den nano-Hydroxylapatit-haltigen Zahnpasten eine Abnahme

der Läsionstiefen. Die Zahncremes hatten eine remineralisierende Wirkung auf den Zahnschmelz und das Dentin. Vermutet wurde die Bildung einer calciumfluoridhaltigen Deckschicht bei der fluoridhaltigen Zahncreme, die ein tieferes Eindringen von Ionen verhindert. Die Zunahme der Läsionstiefe wurde auf den pH-Abfall während des Putzzyklus zurückgeführt. Im Gegensatz dazu war der pH-Wert bei den n-HA-Zahncremes höher. Allerdings konnte bei der gewählten Methode eine direkte Einlagerung von Kristalliten in die Defekte nicht nachgewiesen werden. Die tägliche Anwendung von n-HA-Zahncremes hätte demnach ein gutes Potenzial, die Remineralisierung zu verbessern.

Die Applikation von n-HA-Pasten als präventive Maßnahme um demineralisierenden Effekten vorzubeugen untersuchten Comar *et al.* (2013). Unabhängig von der Konzentration des n-HA konnte keine präventive Wirkung festgestellt werden. Vermutet wurde eine geringere Wasserlöslichkeit der experimentell hergestellten n-HA-Pasten, die zu einer verschlechterten Reaktion mit der Zahnoberfläche führt. Auch die mögliche Einlagerung der Hydroxylapatitkristallite in oberflächliche Defekte verringerte nicht die Demineralisierung. Das verwendete zyklische pH-Modell sollte *in vitro* demineralisierende und remineralisierende Phasen simulieren. Der in anderen Untersuchungen gezeigte remineralisierende Effekt auf Schmelz und Dentin wurde auf die höhere Gewichtung der Remineralisierung zurückgeführt. In den bovinen Prüfkörpern wurden in diesem Versuch oberflächliche, aber keine erosiven Defekte erzeugt. Bestimmt wurden die Festigkeit der Schmelz- und Dentinproben. Die Widerstandsfähigkeit des Hartgewebes gegen mechanische Belastung wurde in Beziehung zum Mineralisationsgrad der Hartschubstanzen gesetzt. Appliziert wurden experimentell hergestellte n-HA-Pasten (Anteil von 10% und 20% nano-Hydroxylapatit), mit und ohne Fluorid, sowie eine kommerzielle Paste mit einem Casein-Phosphopeptid stabilisierten amorphen Calcium-Phosphat (CPP-ACP). Als Kontrolle diente eine fluoridhaltige Paste. In diesem Modell konnte kein calciumphosphathaltiges Präparat die Demineralisation reduzieren. Im Schmelz konnten die n-HA-Pasten die demineralisierten Bereiche nicht verringern und zu keiner Verbesserung der Festigkeit führen. Bei der fluoridhaltigen Kontrollgruppe konnte im Härte-test eine Verbesserung der Festigkeit des Schmelzes dargestellt werden. Bei anderen Defekttiefen und unter den untersuchten Gruppen ergaben sich keine Unterschiede. Der Zusatz von Fluorid zu den experimentellen Pasten führten zu keiner Verbesserung, möglicherweise weil NaF und n-HA in der Mischung reagieren und dadurch die verfügbare Menge löslichen Fluorides reduziert wird. Daher wurden weitere Untersuchungen gefordert, die die komplexen Verhältnisse der Mundhöhle nachempfinden. Die Verfügbarkeit von Fluoridionen während eines pH-Abfalles im oralen Milieu fördert die Einlagerung von Fluor in Apatitkristalle und behindert die Demineralisierung. Fluoride erscheinen in diesem Modell die beste Möglichkeit, die Demineralisation zu reduzieren. Daher wurden weitere Untersuchungen zu den experimentellen n-HA Pasten *in vivo* gefordert.

Der Fragestellung der Einlagerung von nano-Hydroxylapatit in die Zahnhartsubstanzen ist in einer weiteren *In-vivo*-Studie nachgegangen worden (Souza *et al.*, 2015). An 13 Probanden wurden experimentelle Mischungen an einem Schienensystem mit bovinen Schmelz- und Dentinproben getestet. Verglichen wurde eine Mischung mit einem 10%igen Hydroxylapatit-anteil und 0,2% NaF mit einer



CPP-ACP-haltigen Mischung und einer natriumfluoridhaltigen Mischung. Gemessen wurden der Mineralverlust der Proben und die Läsionstiefe nach experimentell erzeugten Demineralisierungen. Bei den Dentinproben konnte bei den hydroxyl-apatithaltigen Mischungen eine signifikante Reduktion des Mineralverlustes festgestellt werden. Die Autoren führten die besseren Ergebnisse im Dentin auf die kalkifizierte kollagene Matrix zurück. Das Kollagen bildet ein dreidimensionales Gerüst, in das die Hydroxylapatit- Kristallite eingebettet sind. Sie vermuteten, dass bei Herauslösen der Kristallite das nano-Hydroxylapatit aufgrund seiner Dimension in diese großen und durchlässigen Läsionen besser eindringen kann.

Klinische Untersuchungen in einer Gruppe mit einem hohen Kariesrisiko zeigten, dass die Anwendung einer fluoridfreien, hydroxylapatithaltigen Zahncreme sich nicht signifikant auf die Kariesaktivität im Vergleich zu einer kommerziell erhältlichen fluoridhaltigen Zahncreme auswirkt (Schlagenhauf *et al.*, 2018). Bei kieferorthopädisch festsitzend behandelten Probanden wurde eine fluoridfreie Zahncreme mit einem 10%-igen Hydroxylapatitanteil mit einer amin- und fluoridhaltigen Zahncreme verglichen. Der Untersuchungszeitraum betrug 6 Monate. Gemessen wurden der Plaqueindex, der Gingivaindex und die Kariesaktivität an den vestibulären Flächen der Zähne 15 bis 25. Bei etwa 40% beider Gruppen traten keine neuen kariösen Läsionen an den untersuchten Flächen auf. Daher wurde gefolgert, dass die hydroxylapatithaltige Zahncreme der fluoridhaltigen nicht unterlegen ist. Gefordert wurden weitere Untersuchungen mit Probanden unterschiedlichen Alters und verschiedener kariogener Einflüsse.

### 2.2.3 Tubulusokkludierende Wirkstoffe

Tubulusokkludierende Wirkstoffe sollen tief in die Tubuli eindringen und zu stabilen Verschlüssen führen, ohne die Pulpa zu schädigen (Priyadasini *et al.*, 2018). Wenn eröffnete Tubuli durch Calciumphosphat verschlossen werden, scheint dieser Prozess der natürlichen Mineralisation von Dentin ähnlich zu sein. Ein Verfahren zur Herbeiführung von Ausfällungen auf der Dentinoberfläche ist *in vitro* mit einer Lösung von Calcium- und Phosphat-Ionen bei niedrigem pH und anschließender Neutralisation mit einer NaOH-Lösung gefunden worden. Bei Zugabe von Natriumfluorid zur Neutralisationslösung konnten bei steigender Konzentration die Umwandlung von Dicalcium-Phosphaten zu Hydroxylapatit in den Tubuli beobachtet werden (Suge *et al.*, 1995).

Partikuläre Wirkstoffe werden zum Verschluss freiliegender Dentintubuli und damit zur Therapie von Dentinhypersensibilität eingesetzt (Arnold *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Bae *et al.*, 2015; Faroqq *et al.*, 2015; Jena *et al.*, 2017; Kulal *et al.*; 2016, Mae *et al.*, 2016). Hydroxylapatit entspricht dem Mineral, aus dem die Zähne bestehen. Man spricht beim Gebrauch von hydroxylapatithaltigen Produkten auch von biomimetischer Zahnpflege. Vorteilhaft hierbei ist die strukturelle und chemische Ähnlichkeit des Wirkstoffes mit dem natürlichen Schmelz (Enax *et al.*, 2017).

Die Wirkung partikulärer Zusatzstoffe in Zahncremes, die bereits käuflich erhältlich sind, wurde in einigen Untersuchungen verglichen. Arnold *et al.* (2015) simulierten in einem Putzversuch eine einjährige Anwendung von sechs verschiedenen Zahncremes. Fünf der Produkte sollen nach Herstellerangabe die Dentinhypersensibilität therapieren. Bei dem Wirkstoff Zink-Carbonat-Hydroxylapatit waren verschlossene Tubuli festzustellen, eine Behandlung mit Zitronensaft reduzierte die Verschlussrate. Eine zinnfluoridhaltige Creme wies ebenfalls oberflächliche Verschlüsse auf, ein Eindringen der Ausfällungen in den Tubulus war nicht nachweisbar. Bei Arginin-Calcium-Carbonat war oberflächlich ein okkludierender Effekt zu erkennen. Der oberflächliche Verschluss von freiliegenden Tubuli konnte daher bei einigen Zahncremes bestätigt werden, allerdings waren die Verschlüsse nicht säurestabil. Bei keiner Zahncreme konnte ein kompletter Verschluss der Tubuli nachgewiesen werden.

Eine experimentell hergestellte Zahncreme aus Tetracalcium-Phosphat und Monetit (TTCPMF) ist in einem *In-vitro*-Versuch mit zwei kommerziell erhältlichen Cremes (Sensodyne und Colgate) verglichen worden (Medvecký *et al.*, 2017). Die experimentell hergestellte Zahnpaste wurde vor der Anwendung ein Jahr bei 25 °C gelagert. Monetit ist ein natürlicherweise vorkommendes, wasserfreies Calciumphosphat, dem Fluor zugesetzt wurde. In dem Versuch wurden Dentinscheiben mit Zitronensäure demineralisiert, die Remineralisierung sollte über die Anwendung der Zahncremes und nachfolgende Lagerung in künstlichem Speichel erfolgen. Die Auswertung der Proben erfolgte rasterelektronenmikroskopisch. Erfasst wurden die Mikrohärtigkeit, die Oberflächenrauigkeit und die Eindringtiefe von Ausfällungen in die Dentintubuli. Die quantitative Analyse der Ausfällungen erfolgte mittels EDX-Analyse (engl.: energy dispersive X-ray spectroscopy=EDX). Rasterelektronenmikroskopisch konnten bei allen Zahncremes eine größere Rauigkeit als in der Vergleichsgruppe festgestellt werden. Die Oberfläche bei TTCPM zeigte vor dem ersten Zyklus eine glattere, aus kleineren (50-70 nm) Partikeln bestehende Schicht. Diese glatte Schicht soll nach Ansicht der Autoren in oralem Milieu zu einer verringerten bakteriellen Adhäsion und Plaqueauflagerung führen. Im De- und Remineralisationszyklus bildeten sich schneller und ausgeprägter Hydroxylapatit und Fluorhydroxylapatit. Alle untersuchten Zahncremes okkludierten Dentintubuli und zeigten remineralisierende Wirkung auf der Oberfläche.

Die Stabilität der Tubulusokklusion nach der Anwendung von Zitronensäure untersuchten Chen *et al.* (2015) an Dentinscheiben von menschlichen Molaren. Bei der Applikation von roter Propolis (engl.: red propolis extract=RPE) war die höchste Verschlussrate festzustellen. Propolis ist ein von Bienen erzeugtes Produkt. Die harzähnliche Masse hat fungizide, antibakterielle, antivirale, entzündungshemmende und antioxidative Eigenschaften. Bei Calcium-Natrium-Phosphosilikat (Novamin) und Arginin-Calcium-Carbonat (ACC) konnten nach der Applikation kristallähnliche Depots im Rasterelektronenmikroskop festgestellt werden. Nach Säureanwendung waren die Dentintubuli zum Teil eröffnet. Arginin und Calciumcarbonat bildeten dabei ein dentinähnliches Material. Bei Novamin legte sich eine kristalline Hydroxyl-Carbonat-Apatitschicht auf das Dentin (Chen *et al.*, 2015). Die Aminosäure Arginin kommt natürlicherweise im Speichel vor. Die Kombination mit Calciumcarbonat soll

eine tubulus-okkludierende Wirkung entwickeln, ähnlich der Fähigkeit des Speichels, freiliegende Tubuli zu verschließen (de Melo Alcencar *et al.*, 2019).

Novamin wurde auch hinsichtlich der Applikationsmethode elektronenmikroskopisch untersucht (Ma *et al.*, 2016). Dabei wurde das Novamin mit einem Schienenmaterial auf humane Dentinproben aufgebracht und mit Prüfkörpern verglichen, bei denen es mit Wattepellets über eine Woche 2-mal täglich aufgetragen wurde. Die Lagerung erfolgte in künstlichem Speichel. Bei der Schienenapplikation konnte in der qualitativen rasterelektronenmikroskopischen Auswertung eine Erhöhung der Anzahl der verschlossenen Tubuli und ein tieferes Eindringen der Ausfällungen festgestellt werden. Eine statistisch signifikante Verkleinerung der Tubulusdurchmesser im Vergleich zu den topisch applizierten Proben wurde ebenfalls nachgewiesen. Vermutet wurde, dass die Schiene die Prüfkörper vor Auswaschungen des Lagerungsmediums schützt und die Eindringtiefe der Ausfällungen in die Tubuli verbessert.

In einer weiteren *In-vitro*-Studie von Novamin und der Aminosäure Arginin enthaltenden Zahncremes konnte die obliterierende Wirkung beider Wirkstoffe bestätigt werden (Kulal *et al.*, 2016). Die statistisch signifikant beste Verschlussrate erzielte allerdings eine nano-Hydroxylapatit-haltige Zahncreme. Wegen der geringen Kosten und der guten Anwendbarkeit favorisierten die Autoren nano-Hydroxylapatit für die häusliche Anwendung.

Die Stabilität und Qualität der Tubulusverschlüsse von Novamin ist mit Duraphat und Gluma nach einem Erosions/Abrasionsmodell verglichen worden (Jao-Souza *et al.*, 2018). Die Agenzien wurden den Herstellerangaben entsprechend appliziert. Um die oralen Bedingungen nachzuempfinden wurden humane Dentinprüfkörper in Speichel gelagert. Nach einmaliger Anwendung und einem Putzzyklus über 5 Tage mit erosiven Effekten durch Zitronensäure erfolgten Dentinpermeabilitätsmessungen und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen. Der abrasive Effekt wurde durch eine 2-minütige Putzsimulation mit einer fluoridhaltigen, kommerziell erhältlichen Zahncreme nachempfunden. Unter den gewählten Bedingungen war bei Gluma und Novamin eine signifikante Abnahme der Permeabilität festzustellen. Nach der Anwendung von Duraphat war im REM eine aufgelagerte Schicht erkennbar, die nach dem Zyklus nicht mehr festzustellen war. Vermutet wurde, dass die calciumfluoridhaltige Schicht sich durch die imitierten Abrasionen löst.

Dass die Fluorid-Mineralen eine geringere Stabilität in den Tubuli besitzen, konnte auch nach einer Säurebehandlung in einem weiteren *In-vitro*-Versuch mit verschiedenen Zahncremes gezeigt werden. Untersucht wurden drei kommerziell erhältliche Cremes mit den Wirkstoffen Hydroxylapatit, Novamin und Fluorid (Farooq *et al.*, 2015). Neben einem Zahnputzversuch und anschließender Säureeinwirkung wurden Proben in Mischungen der Cremes mit künstlichem Speichel gelagert. Die rasterelektronenmikroskopisch analysierte Verschlussrate war bei der hydroxylapatithaltigen Paste im Putzversuch nach Säureanwendung ähnlich hoch wie bei den unbehandelten Proben. Die Tubuli lagen bei Anwendung der fluoridhaltigen Creme frei. Bei den in künstlichem Speichel gelagerten Proben zeigte

sich bei Hydroxylapatit und Novamin eine amorphe Partikel enthaltende Schicht auf dem Dentin. Die Autoren vermuteten einen Anstieg der Calcium- und Phosphat-Ionen im Speichel und eine dadurch ausgelöste Kristallisation.

Der Zusatz von nano-Hydroxylapatit zu einer experimentellen Zahncreme ohne Fluorid, im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Zahncremes mit Novamin, Kaliumsalzen und Hydroxylapatit, ergab in einem weiteren *In-vitro*-Versuch eine höhere Verschlussrate der Tubuli (Jena *et al.*, 2017). Die Dentinproben wurden über 14 Tage 2-mal täglich einer Putzsimulation unterzogen und in künstlichem Speichel gelagert. Vermutet wurde, dass das nano-Hydroxylapatit aufgrund der Partikelgröße leichter in die Tubuli integriert werden kann.

Den Einfluss der Partikelgröße untersuchten ebenfalls Kunam *et al.* (2016). Sie synthetisierten nano-Hydroxylapatit Kristallite in der Größe von 18,3 - 32,2 nm aus Eierschalen und verglichen die Verschlussraten und Eindringtiefen einer natriumfluoridhaltigen Lösung mit einer wässrigen Lösung von nano-Hydroxylapatit und einer Mischung von NaF mit nano-HA. Die in künstlichem Speichel gelagerten Proben wurden nach 7 Tagen rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die signifikant höchsten Eindringtiefen und dichtesten oberflächlichen Auflagerungen wurden bei der gemischten Lösung gefunden. Sie vermuteten daher einen synergistischen Effekt. Die nano-HA-Partikel sollen wegen ihrer Größe in die Tubuli eindringen können und das Natriumfluorid mit Calcium zur Bildung von Calciumfluorid-Kristallen führen. In der natriumfluoridhaltigen Lösung zeigten sich dagegen wallartige Verengungen der Tubuluseingänge durch feine Ausfällungen. Der komplette Verschluss war seltener festzustellen (Kunam *et al.*, 2016).

Im Gegensatz dazu konnten Favretto *et al.* (2018) in ihrer *In-vitro*-Untersuchung keinen Einfluss der Partikelgröße auf die Obliteration der Dentinkanäle finden. Es sind in dieser Studie Natrium-Trimetaphosphat (TMP) Nano- und Mikropartikel experimentell hergestellten Zahncremes zugesetzt worden. Die Partikelgröße lag bei 400 nm bei den Mikropartikeln und 25 nm bei den Nanopartikeln. Die Zahncremes waren fluoridhaltig (1000 ppm). Nach einem Zahnputzversuch über 7 Tage mit bovinen Dentinblöcken unter Spülung mit Speichel wurde der Einfluss der Partikelgröße auf den Verschluss der Dentintubuli, das atomare Gewicht der Ausfällungen und der Mineralgehalt elektronenmikroskopisch und röntgenspektroskopisch (EDX) untersucht. Die Proben wurden nach Säurebehandlungen mit den nicht behandelten verglichen. Es zeigte sich bei allen TMP-haltigen Zahncremes eine bessere Verschlussrate und ein höhere Mineralgehalt als bei der Placebogruppe und der alleinigen Anwendung der Fluoridzahncreme (56% höhere Obliteration). Die Partikelgröße hatte keinen Einfluss auf die Verschlussrate.

Die Dentinpermeabilität ist ein weiteres Kriterium, um tubulusokkludierende Wirkungen festzustellen (Lucchese *et al.*, 2018). In einer *In-vitro*-Studie wurde eine zinnfluorid- mit einer natriumfluoridhaltigen Zahncreme verglichen. Die Dentinproben wurden in einem Putzversuch mit Zitronensäure behandelt und in künstlichem Speichel gelagert. Im REM konnte eine Tubulusokklusion bei allen Pro-

ben nach der Lagerung in künstlichem Speichel festgestellt werden. Es wurden allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Reduktion der Permeabilität gefunden. Die Applikation von Zitronensäure und Lagerung der Proben für 24 h in künstlichem Speichel führten zu einer Erhöhung der Permeabilität. Die Autoren vermuteten, dass der Speichel Partikel aus den Tubuli lösen kann, aber auch Ausfällungen durch die im Speichel enthaltenen Salze gebildet werden. Bei der Lagerung in künstlichem Speichel sollen mehr Partikel gelöst werden, als durch Remineralisation neu gebildet werden.

Die Dentinpermeabilität wurde ebenfalls als Kriterium zur Untersuchung der Wirksamkeit der Tubulusokklusion bei Gao *et al.* (2017) herangezogen. Verglichen wurden Natriumfluorid mit Dendrimern (PAMAM= Poly (amido amine) dendrimer). Es zeigte sich für die Dendrimere eine höhere Säurestabilität in diesem *In-vitro*-Versuch. Die Dentinproben wurden nach Auftragen der Wirkstoffe in zeitlichen Abständen von 7 bis 28 Tagen rasterelektronenmikroskopisch untersucht und bei einer Dentinpermeabilitätsmessung verglichen. Die Lagerung erfolgte in künstlichem Speichel. Bei den mit Natriumfluorid behandelten Proben war eine sich schneller bildende, aber instabilere Kristallschicht festzustellen. Die Kristalle bei PAMAM waren nadelartig und tiefer in die Tubuli eingedrungen. Nach 28 Tagen zeigte sich eine signifikant niedrigere Dentinpermeabilität. Die Autoren führten dies auf den länger dauernden Kristallisationsprozess bei dem organischen Dendrimermolekül zurück. Sie vermuteten, dass eine sich schneller bildende anorganische Kristallschicht bei dem Natriumfluorid-Präparat ein weiteres Eindringen von Calcium- und Phosphat-Ionen in die Tubuli verhindert.

Den Dendrimern wird das Potenzial zugeschrieben, die Rolle von nicht-kollagenen Proteinen bei der Biom mineralisation von Dentin zu übernehmen. Das wurde nach einem Putzversuch an demineralisierten Dentinscheiben mit experimentell hergestellten, mit nano-Hydroxylapatit funktionalisierten, Dendrimern vermutet (Lin *et al.*, 2017). Nach 7 Tagen erfolgte eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Dentinproben. Die Proben lagerten im Versuchszeitraum in künstlichem Speichel oder in entionisiertem Wasser. Unabhängig vom Lagerungsmedium zeigte sich eine Bindungsfähigkeit der Dendrimere an freiliegende Kollagenfibrillen. Die Autoren vermuteten eine Bindung der reaktiven negativ geladenen COOH-Gruppen der Dendrimere mit den positiv geladenen Typ-1-Bändern des Kollagens. In der Kontrollgruppe wurde der Putzversuch mit entionisiertem Wasser durchgeführt und die Proben in künstlichem Speichel gelagert. Es war rasterelektronenmikroskopisch kein Verschluss der Tubuli zu erkennen. Die Tubuli waren nicht mit Kristallen gefüllt. Es wurde gefolgert, dass die demineralisierte Kollagenmatrix alleine nicht die Fähigkeit hat, aus einer Mineralquelle wie dem künstlichen Speichel, Kristallisationskerne zu bilden.

Neben der Verschlussrate und der Durchflussrate der Dentintubuli wurde in einer *In-vitro*-Untersuchung an einwurzeligen Zähnen die mechanischen Eigenschaften nach der Behandlung mit auf Methacrylat-Nanopartikel basierenden Lösungen geprüft (Toledano-Osorio *et al.*, 2018). Es wurde angenommen, dass Mikrofrakturen im Dentin ein Fortschreiten von Demineralisierungen und die Entstehung von Karies begünstigen. Den experimentellen Lösungen wurden Zink, Calcium und

Doxycyclin zugesetzt. Doxycyclin soll die Metalloproteinasen im Dentin hemmen und dadurch Mikrofrakturen verhindern. Die Tubulusverschlussrate nahm bei dieser Lösung nach 7 Tagen ab. Die Autoren vermuteten daher eine schlechtere desensibilisierende Wirkung. Bei den auf Calcium und Zink basierenden Lösungen konnte nach 7 Tagen ein kompletter Verschluss der Tubuli festgestellt werden. In der EDX Analyse konnte Calciumphosphat als Hauptbestandteil der Ausfällungen nachgewiesen werden. Bei der mechanischen Belastung waren die Ergebnisse mit den zinkhaltigen Lösungen besser als die der calciumhaltigen Lösungen. Die ausgebildeten Kristallite ordneten sich stab- artig intra- und peritubulär an. Die Form der Kristallite soll Einfluss auf die mechanischen Eigen- schaften haben. Die Autoren sahen weitere Untersuchungen als erforderlich an, die längere Zeiträume und das orale Milieu berücksichtigen.

Die Wirkung von kommerziell erhältlichen, desensibilisierenden Mitteln sind *in vitro* in einem Erosions/Abrasionsmodell profilometrisch und rasterelektronenmikroskopisch untersucht worden (Garofalo *et al.*, 2019). Getestet wurden Duraphat, DesensibilizeNano P (Calciumphosphat, NaF und  $\text{KNO}_3^-$ ), ClinPro XT Varnish (Glaspartikel von Fluor-Aluminium-Silikat, Calcium-Glycerophosphat) und ClinPro White Varnish (NaF, Tricalcium, Phosphat). Die 4-mal tägliche Applikation einer 0,3%igen Zitronensäure über 5 Tage sollte erosive Effekte imitieren. Abrasive Effekte wurden durch 2mal tägliches Putzen mit einer elektrischen Zahnbürste simuliert. Dazwischen wurden die Proben in künstlichem Speichel gelagert. Die quantitative Erfassung des Tubulusverschlusses zeigte bei allen Mitteln nach dem Auftragen keine signifikanten Unterschiede bei der Verringerung der Zahl offener Tubuli. Nach dem Erosions/Abrasionszyklus war bei XT Varnish ein bestehender Tubulusverschluss festzustellen. Vermutet wurde eine Ionenbindung des enthaltenen Glases an das Calcium des Hydroxylapatites und die Bildung einer physikalischen Barriere. Dadurch soll ein direkter Säureangriff auf die Oberfläche unterbunden werden. Profilometrisch zeigte sich ein geringerer Abtrag. Allerdings wurde auch das komplette Herauslösen der bedeckenden Schicht beobachtet. Bei Duraphat konnte ein geringerer Abtrag festgestellt werden, die Tubuli waren nicht stabil verschlossen. Die Autoren forder- ten daher weitere Untersuchungen, um den Einfluss von Säure und Abrasion auf die Adhäsion aufge- lagter Schichten, vor allem in längeren Zeitintervallen, zu untersuchen.

Die Auswirkungen von unterschiedlichen Fluorkonzentrationen auf die Oberfläche von Dentinschei- ben sind bei experimentell hergestellten fluoridierten nano-Hydroxylapatit-Pulvern (=2n FHA bis 10n FHA) im Vergleich zu kommerziell verfügbarem nano-HA *in vitro* untersucht worden. Zudem ist die Biokompatibilität der Proben in zytotoxischen Tests erfasst worden (Yu *et al.*, 2017). Es zeigte sich bei den verwendeten Proben keine toxischen Effekte. Die elektronenmikroskopisch erhobene Ver- schlussrate der Dentintubuli stieg mit zunehmenden Fluorkonzentrationen. Bei der 8n FHA-Probe war zudem die Eindringtiefe in die Tubuli signifikant höher. Die Form der Kristalle veränderte sich mit steigender Konzentration von locker stäbchenartig (2n und 4n FHA) zu langen, durchgehenden Stäb- chen (6n) und schließlich den Tubulus komplett verschließenden Kristallen (8n FHA). Die Autoren folgerten, dass durch die Zugabe von Fluor die Stabilität der Kristalle verbessert wird.

Zytotoxizitätsuntersuchungen von experimentell hergestellten nano-Hydroxylapatit-Suspensionen im Vergleich zu 1%, 2% und 3% fluoriddotiertem nano-HA wurden ebenfalls von Baglar *et al.* (2018) durchgeführt. Die Lagerung der Proben erfolgte in dieser *In-vitro*-Studie in SBF (engl.: simulated body fluid). Diese simulierte Körperflüssigkeit ähnelt in der Ionenkonzentration dem Blutplasma und ermöglichte über den Versuchszeitraum von 4 Wochen die Analyse der Abbauprodukte und eine pH-Wert Bestimmung. Es zeigten sich bei allen nano-HA-Mischungen im Rasterelektronenmikroskop Verschlüsse der Tubuli oder Ausfällungen auf der Oberfläche. Die besten Ergebnisse wurden bei der reinen nano-HA-Suspension und der 1% fluoriddotierten Suspension erzielt. Bei höherer Fluoridkonzentration war die Oberfläche nicht vollständig bedeckt, die Tubuli aber noch verschlossen. Die höheren Fluoridkonzentrationen führten zu einem Rückgang der Zellproliferation, waren allerdings nicht toxisch.

#### 2.2.4 Klinische Anwendungen

Es gibt eine Vielzahl von klinischen Untersuchungen zur Wirksamkeit desensibilisierender Agenzien. Die meisten experimentellen Studien zu Hydroxylapatit und nano-Hydroxylapatit beschäftigen sich mit der Remineralisation von Zahnschmelz und in geringerem Ausmaß mit dem Dentin. In neuerer Zeit werden die Apatite auch in klinische Untersuchungen zur Behandlung von Hypersensibilitäten eingeschlossen.

Eine häufige Form der Applikation ist dabei die häusliche Zahnpflege mit Zahnpasten, denen die Wirkstoffe zugesetzt sind. Die Beobachtungszeiträume variieren dabei stark von wöchentlicher Anwendung bis zu Untersuchungszeiträumen über mehrere Monate. Daneben wird auch die topische Anwendung untersucht, die entweder in der zahnärztlichen Praxis erfolgt oder zum Beispiel über Schienensysteme (Amaechi *et al.*, 2018). In der häuslichen Anwendung erfolgt das Auftragen auch manuell oder mit einfachen Mitteln wie Wattestäbchen (Low *et al.*, 2015). Zur Beurteilung der empfundenen Schmerzen werden Instrumente wie die visuelle Analogskala oder die DPS (engl.: dental pain scale) benutzt. In den klinischen Untersuchungen wird die Überempfindlichkeit taktil mit der Sonde, thermisch mit Eis oder mit dem Luftbläser einer Dentaleinheit überprüft.

Die Auswahl der Probanden und die Durchführung klinischer Studien zur Fragestellung der Dentinhypersensibilität sind problematisch. Empfohlen wird eine doppelblinde, randomisierte Parallelgruppenstudie (Holland *et al.*, 1997). Es sollten nur solche Patienten in Untersuchungen zum Verschluss freiliegender Tubuli eingeschlossen werden, bei denen klinisch auch freiliegende Dentin- oder Wurzel-dentinbereiche festzustellen sind, weil Patienten auch Hypersensibilitäten angeben, ohne das Dentin freiliegt. Diese Patienten besitzen oft einen dünnen Gingivatyp (Moraschini *et al.*, 2018).

Der Mechanismus der meisten desensibilisierenden Mittel beruht auf einer Unterbindung der Flüssigkeitsbewegung in den Dentinkanälchen durch Auflagerung auf der Dentinfläche oder Einlagerung in die Tubuli. Dabei kann unterschieden werden in eine physikalische Wirkung, bei der Partikel oder

Nanopartikel in die Tubuli eingelagert werden, eine chemische Okklusion durch Mineralausfällungen auf der Oberfläche und die pharmakologische Blockade der nervalen Weiterleitung durch Kaliumverbindungen. Es hat sich bisher kein Goldstandard in der Therapie von Dentinhypersensibilitäten etabliert (Moraschini *et al.*, 2018).

In einem systematischen Review mit Metaanalyse konnte die Effektivität von nano-Hydroxylapatit im Vergleich zu anderen potenziell desensibilisierenden Mitteln dargestellt werden (de Melo Alencar *et al.*, 2019). Allerdings ist nur eine geringe Anzahl von Studien eingeschlossen worden. Da die längste Untersuchung einen Zeitraum von 3 Monaten erschloss und die weiteren nach 4 Wochen abgeschlossen wurden, forderten die Autoren weitere Verlaufskontrollen.

Eine weitere Metaanalyse aus dem Jahr 2018 verglich die Wirkung von in-office-Behandlungen und häusliche Anwendungen (Moraschini *et al.*, 2018). Eingeschlossen wurden 25 Untersuchungen aus der Zeitspanne 1992-2016. Dabei zeigten sich bei den chemisch und physikalisch wirkenden in-office-Präparaten im Vergleich zum Placebo signifikante Reduzierungen der Hypersensibilität. Im Gegensatz dazu war eine Abnahme der Hypersensibilität bei häuslich anzuwendenden, chemisch wirkenden und die nervale Reizweiterleitung unterbindenden Produkten besser als bei der Anwendung eines Placebo. Die Schwierigkeit klinischer Untersuchungen zur häuslichen Anwendung sahen die Autoren in der Standardisierung. Es ist nicht gewährleistet, dass die Probanden trotz der Instruktionen die Pflegemittel korrekt anwenden.

Dieser Frage der häuslichen Anwendung ist in einer klinischen Studie nachgegangen worden. Über drei Monate wurde die Kombination einer in-office Therapie mit kommerziell erhältlichen Präparaten untersucht. Die Wirkstoffe waren Arginin, n-HA und ein fluoridhaltiges Präparaten (Wang *et al.*, 2016). Verglichen wurde Duraphat mit einem argininhaltigen Produkt (Desensibilize Nano-P) mit zusätzlicher Anwendung einer experimentell hergestellten nano-Hydroxylapatit-haltigen Zahncreme und der alleinigen Anwendung einer argininhaltigen Zahncreme (Pro-Relief). In den ersten drei Wochen erfolgte eine wöchentliche professionelle Applikation. Danach trugen die Teilnehmer das jeweilige Mittel nach der Zahnpflege für 4 min auf. Die häusliche Pflege wurde über den gesamten Zeitraum mit einer fluoridhaltigen Zahncreme durchgeführt, außer in der Arginin-Gruppe, hier wurde nur die Arginin enthaltende Zahnpaste angewandt. Diese Gruppe zeigte über die gesamten drei Monate eine abnehmende Empfindlichkeit. Ein ähnliches Ergebnis wurde in den n-HA Gruppen erreicht. Hier waren sowohl nach der 3-maligen professionellen Applikation als auch bei der experimentellen n-HA Paste ein Rückgang der Empfindlichkeit nach einem und drei Monaten festzustellen. Den Vorteil in der professionellen Anwendung sahen die Autoren in dem schnell zu erreichenden Ergebnis, unabhängig von der häuslichen Mitarbeit, wie sie in der Arginin-Gruppe erforderlich war. Das natriumfluoridhaltige Produkt (Duraphat) ist in der professionellen Anwendung weit verbreitet und zeigte in dieser Untersuchung nach drei Monaten einen geringeren Effekt. Vermutet wurde, dass die fluoridhaltigen Ausfällungen über die Dauer im oralem Millieu nicht stabil sind. Die Autoren forderten weitere Untersuchungen zur Stabilität und Zusammensetzung der



vermuteten Tubulusverschlüsse. Der Einfluss von den Zusatzstoffen, in diesem Fall Fluoride und Kaliumnitrat in der verwendeten experimentellen nano-HA-Paste, war in dem gewählten Versuchsaufbau ebenfalls nicht zu klären. Die Autoren schlussfolgerten, dass die mögliche Reduzierung der Anzahl von in-office Behandlungen ein Vorteil der Pflegeprodukte mit nano-Hydroxylapatit sein kann.

Im Gegensatz dazu zeigten Orsini *et al.* (2013) in einer klinischen Studie mit drei verschiedenen Zahncremes mit den Wirkstoffkombination Arginin und Natriummonofluorophosphat, Strontiumacetat und Natriumfluorid sowie Zinkcarbonat-Hydroxylapatit eine Reduzierung der Dentinhypersensibilität bereits nach drei Tagen.

Eine deutliche Verbesserung von Hypersensibilitäten ließ sich bei einer Anwendung von einer nano-Hydroxylapatit-haltigen Zahncreme in einer klinischen Studie mit 105 Probanden feststellen (Vano *et al.*, 2018). Im Vergleich zu einem fluoridhaltigen Gel gaben die Probanden sowohl nach 2 Wochen als auch nach 4 Wochen einen stärkeren Rückgang der Symptome an.

Allerdings zeigen einige vergleichende klinische Untersuchungen ähnliche Ergebnisse von nano-HA zu anderen desensibilisierenden Mitteln. So fanden Gopinath *et al.* (2015) in einer 4-wöchigen Studie keine signifikanten Unterschiede in der Reduzierung der Hypersensibilität bei der Verwendung einer fluoridfreien Zahncreme mit einem Anteil von 1% n-HA im Vergleich zu einer novaminhaltigen Zahncreme.

Fluoride werden wegen ihres remineralisierenden Effektes in der Kariesprophylaxe genutzt. Sie werden in verschiedenen chemischen Zusammensetzungen in Zahncremes, Spüllösungen oder in-office Präparaten angewandt (Zinnfluoride, Natriumfluoride, Amifluoride). In der hier vorgelegten *In-vitro*-Studie wird ein kommerziell erhältliches Fluid (elmex fluid) mit einem Fluoridgehalt von 1,0% benutzt. Nach Herstellerangabe sind 0,287 g Aminfluorid Dectafluor, 3,032 g Aminfluorid Olafluor und 2,210 g Natriumfluorid pro 100 g enthalten. Die Ansammlung von Aminfluoriden auf der Oberfläche soll zu einem Ausfall von Calcium-Fluorid ähnlichen Depots führen. Aus diesen Depots werden Fluoride abgegeben. Durch die Ausbildung dieser Calciumfluorid-Deckschichten sollen Dentintubuli bedeckt oder obliteriert werden (Herstellerangabe Fa. GABA, Hamburg).

### 2.3 Ziel der Arbeit und Fragestellung

Als beeinflussende Faktoren für die Schmerzempfindung am Dentin gelten die Anzahl der freigelegten Dentinkanäle und deren Durchmesser. Die Nociception scheint an der Pulpa-Dentin-Grenze zu entstehen, wobei immer offene Dentinkanäle an der Schmerzentstehung beteiligt sind. Daraus folgt, dass Maßnahmen zum Verschluss von offenen Dentinkanälen ein wirksames Mittel zur Schmerzlinderung sind. Es werden Mittel gesucht, die eine schnelle und dauerhafte Tubulusokklusion gewährleisten und im oralen Milieu beständig sind. Dabei können Zahncremes auf der einen Seite geeignete Wirkstoffe aufbringen, auf der anderen Seite können sie durch abrasive Effekte zur Freilegung von Dentinkanälen beitragen.

Die tubulusokkludierenden Agenzien sollten die Dentinpermeabilität reduzieren und den Verschluss der Dentintubuli auch im sauren Milieu aufrechterhalten. Gegen abrasive Effekte sollten sie zudem einen stabilen Verschluss gewährleisten (Gao *et al.*, 2017).

Trotz der Vielzahl der propagierten Verfahren hat sich bisher kein Konzept klinisch etablieren können, um die Dentinhypersensibilitäten dauerhaft und vollständig zu therapieren. Nano-Hydroxylapatite und Hydroxylapatite gelten als kostengünstige und in der Anwendung einfache Mittel zur Behandlung von Hypersensibilitäten. Im Rahmen dieser *In-vitro*-Studie soll untersucht werden, wie nano-Hydroxylapatite alleine und in Kombination mit einem Aminfluoridpräparat auf freiliegende Dentintubuli wirken.

In einer älter werdenden Gesellschaft ist durch verbesserte parodontale und zahnerhaltende Therapien mit einer Zunahme von freiliegenden Wurzelflächen zu rechnen. Freiliegendes zervikales Dentin hat ein höheres Kariesrisiko, es ist gegenüber Säureeinwirkungen weniger resistent als der Zahnschmelz. Die Applikation hochkonzentrierter fluoridhaltiger Mittel ist eine verbreitete Methode zur Kariesprophylaxe. Durch die Ausbildung calciumfluorid-haltiger Deckschichten sollen zudem die Dentintubuli verschlossen werden. Hydroxylapatite und nano-Hydroxylapatite sollen ebenfalls Präzipitate auf der Zahnoberfläche bilden. Es ist nicht nachgewiesen, ob eine Zuführung von Fluoriden die Wirkung von Hydroxylapatiten verbessert.

Folgende Nullhypothese wird im Rahmen dieser *In-vitro*-Studie untersucht:

- Eine experimentell hergestellte wässrige Suspension von nano-Hydroxylapatit und Mischungen von nano-Hydroxylapatit mit einem Fluoridpräparat weisen in ihrer Wirkung auf Dentintubuli keine Unterschiede zu einem kommerziell erhältlichen Fluoridpräparat auf.

### 3 Material und Methode

#### 3.1 Herstellung der Prüfkörper

An humanen Molaren wurde in der vorliegenden Arbeit der für Dentinhypersensibilitäten relevante, zervikale Bereich der Zähne untersucht. Nach der Extraktion wurden die Zähne mit einem Skalpell von anhaftendem Weichgewebe befreit. Die Zähne wurden in 1%iger Thymollösung gelagert. Es folgte eine Präparation der Zähne parallel zur Zahnachse.

Mit einem Präparationsdiamanten (6847 KR, Fa. Komet) wurden unter ständiger Wasserkühlung die bukkale und orale Schmelzfläche abgetragen, bis das Dentin frei lag. Danach wurde die Oberfläche mit dem entsprechenden Finierdiamanten finiert (8847 KR). Diese Präparation erfolgte parallel zur Zahnachse bis etwa 3 mm unterhalb der Schmelz-Zement-Grenze. Die Flächen wurden anschließend mit Polierscheiben (SoFlex, Fa. 3M) vorpoliert. Der okklusale Schmelzbereich blieb erhalten. Nach der Vorpolitur erfolgte im Abstand von etwa 2-3 mm ein parallel zur vorpolierten Oberfläche geführter Schnitt durch den Zahn, sodass zwei Prüfkörper pro Zahn gewonnen wurden. Die durch den Schnitt freigelegte Pulpa wurde mit einem Rosenbohrer entfernt (Abb. 1).

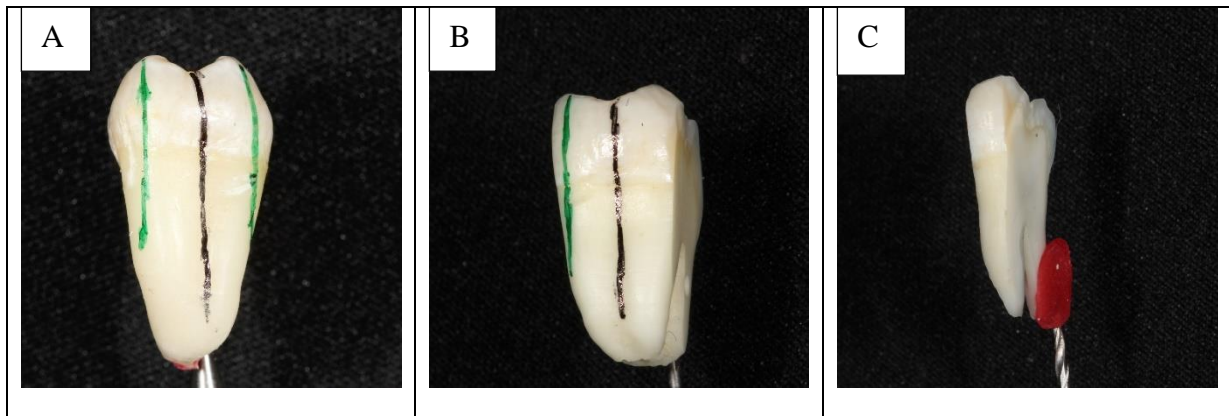


Abbildung 1: Herstellung der Prüfkörper, Zahn 38 in der Ansicht von mesial; grün eingezeichnet ist die abzutragende bukkale und orale Fläche, in etwa parallel zur schwarz eingezeichneten Zahnachse (A), die abgetragene bukkale Fläche, nach der Vorpolitur mit SoFlex Polierscheiben (B) und der bukkal herausgetrennte Prüfkörper (C).

Die Prüfkörper wurden in Blöcke aus Bissregistratsilikon eingebettet (Futar D, Fa. Kettenbach). Anschließend erfolgte die Lagerung in destilliertem Wasser. Die weitere Politur erfolgte unter ständiger Wasserkühlung mit rotierenden Schleifpapieren bei 300 Umdrehungen pro Minute (2V Grinder-Polisher, Fa. Metkon Gripo). Die Feinpolitur wurde bis 4000 Grit ausgeführt. Die Prüfkörper wurden mit einer Lupenbrille (Fa. Zeiss) mit 4,4facher Vergrößerung während der Politur auf Kanten überprüft und gegebenenfalls nachpoliert. Nach der Politur wurden die Proben für 15 min in ein Ultraschallbad (Sonorex, Fa. Bandelin) gegeben. Nach der Entnahme aus dem Ultraschallbad erfolgte die Trocknung mit einem Luftbläser.

Anschließend wurde jeder Prüfkörper zur Hälfte mit einem dünnfließenden Silikon-Abformmaterial (Honigum, Fa. DMG) abgedeckt. Die freibleibende Fläche ist für 15 s mit 35%iger Phosphorsäure (Ultra-Etch, Fa. Ultradent) geätzt worden. Das Ätzelgel wurde mit dem Luft-Wasser-Spray einer Dentaleinheit 15 s abgesprüht. Danach wurde das Silikon vom Prüfkörper entfernt, sodass pro Prüfkörper eine geätzte und eine ungeätzte Fläche entstand. Die Ätzfläche konnte visuell kontrolliert werden, es ergab sich eine milchig erscheinende Oberfläche im Vergleich zur glänzenden, ungeätzten Fläche (Abb. 2).

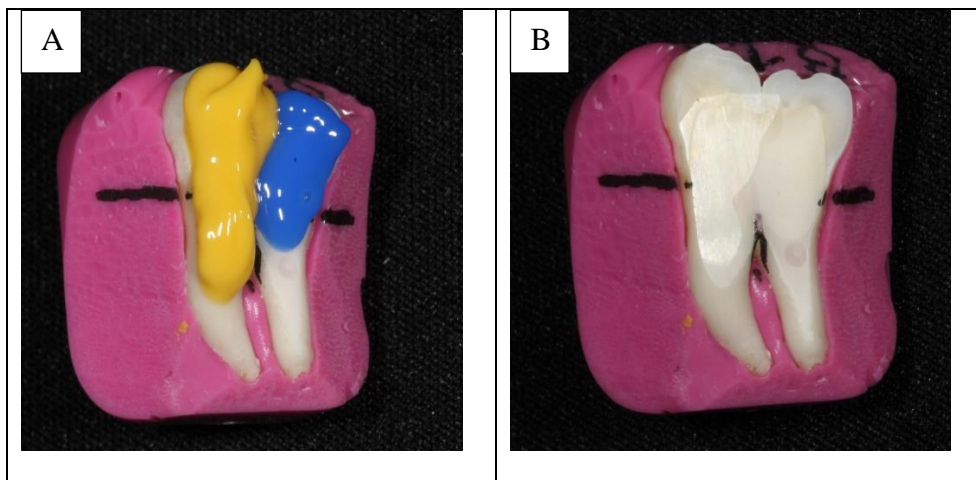


Abbildung 2: In Bissregistratsilikon (Futar D) eingebetteter Prüfkörper nach Isolierung mit einem dünnfließenden Abformsilikon (Honigum) und Applikation des Ätzelgels; Markierung der Schmelz-Zement Grenze im Silikonblock (A), makroskopisch sichtbare Unterscheidung von geätzter und ungeätzter Fläche, rechts die matte geätzte Fläche, links die zuvor abisolierte glänzende, ungeätzte Fläche (B).

### 3.2 Applikation experimenteller Mischungen von nano-Hydroxylapatit, Vorversuche

In der Vorversuchsreihe wurde zunächst die Präparation und Vorbehandlung der Prüfkörper (PK) zur Darstellung des zervikalen Dentins geprüft. Aus 15 Zähnen sind 30 Prüfkörper nach dem in Kapitel 3.1 geschilderten Verfahren hergestellt worden. 6 Prüfkörper sind als Referenzgruppe gewählt worden. Aus den verbleibenden 24 Prüfkörpern wurden zufällig 6 Gruppen mit je vier Prüfkörpern gebildet. Die Applikationsdauer der experimentellen Mischungen von nano-Hydroxylapatit und der kommerziellen Fluoridpräparate elmex fluid und elmex gelee betrug 2 min und 10 min.

Zur Beurteilung der gewählten Verfahren zur Freilegung der Dentinkanäle wurde eine Referenzgruppe gebildet. In der Referenzgruppe wurden die Prüfkörper nicht abisoliert, 6 Prüfkörper wurden unterschiedlicher Vorbehandlung unterzogen, es erfolgte keine weitere Behandlung. Vor der lichtmikroskopischen Untersuchung wurden die Prüfkörper in *A. dest.* gelagert:

- 2 Prüfkörper ohne weitere Behandlung und Ultraschallbad
- 2 Prüfkörper konditioniert mit 35%iger  $H_3PO_4$  für 5 s
- 2 Prüfkörper mit Ätzung 35%iger  $H_3PO_4$  für 15 s.

Für die lichtmikroskopische Auswertung nach der Applikation der experimentellen Mischungen wurden 24 Prüfkörper zur Hälfte abisoliert und mit 35%iger  $H_3PO_4$  für 15 s konditioniert. Nach Entfernung der Isolierung wurden die Prüfkörper 15 min in ein Ultraschallbad gegeben. Danach erfolgte die Applikation der experimentellen Mischungen und kommerziellen Mittel auf der gesamten Fläche der Prüfkörper (Tab. 1) :

- 2 Prüfkörper Applikation der experimentellen Mischung elmex fluid/ Kalident für 2 min, 2 Prüfkörper für 10 min
- 2 Prüfkörper Applikation der experimentellen Mischung elmex gelee/ Kalident für 2 min, 2 Prüfkörper für 10 min
- 2 Prüfkörper Applikation elmex gelee für 2 min, 2 Prüfkörper für 10 min
- 2 Prüfkörper Applikation elmex fluid für 2 min, 2 Prüfkörper für 10 min
- 2 Prüfkörper Applikation Kalident Suspension (dünnflüssig) Applikationsdauer 2 min, 2 Prüfkörper für 10 min
- 2 Prüfkörper Applikation Kalident Suspension (dickflüssig) für 2 min, 2 Prüfkörper für 10 min

*Tabelle 1: Mischungen und Bestandteile der in den Vorversuchen angewendeten Präparate*

| <b>Präparat</b>    | <b>Zusammensetzung</b>  |
|--------------------|---|
| elmex gelee        | 1,25%iges Fluoridgel (Dectaflur 0,278 g, Olaflur 3,032 g, Natriumfluorid 2,210 g pro 100 g Dentalgel), gereinigtes Wasser, Propylenglykol, Hytellose, Saccharin, Apfel-Aroma, Pfefferminzaroma, Krauseminzöl, Mentholaroma, Bananenaroma) |
| elmex fluid        | 1,0%ige Fluoridlösung (Dectaflur 1,150 g, Olaflur 12,126 g pro 100 g Lösung), gereinigtes Wasser Saccharin, Pfefferminzaroma, Krauseminzöl, Anisöl, Levomenthol, Vanillin)  |
| n-HA (dünnflüssig) | Kalident 0,05 g, A. dest.   |
| n-HA (dickflüssig) | Kalident 0,2 g, A. dest.  |
| elmex gelee/n-HA   | Kalident 0,2 g, elmex gelee 0,5 g   |
| elmex fluid/n-HA   | Kalident 0,05 g, elmex fluid 0,1 g  |

### 3.3 Lichtmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie

An einem digitalen Auflichtmikroskop (VHX 5000, Fa. Keyence) erfolgte im Vorversuch eine qualitative Bewertung der Prüfkörper. Untersucht wurden zwei kommerziell erhältliche Fluoridpräparate (elmex gelee und elmex fluid) und Mischungen der Präparate mit einem nano-Hydroxylapatit (Kalident, Fa. Kalichem Italia Srl.) sowie wässrige Suspensionen des n-HA. Bewertet wurde das zervikale Dentin an zwei Positionen. Einmal auf der Höhe der Schmelz-Zement-Grenze und das davon apikal liegende Wurzel-dentin. Zur Orientierung diente die Markierung der Schmelz-Zement-Grenze im Silikonblock, an der der Grenzbereich zwischen geätztem und ungeätztem Dentin aufgesucht wurde (Abb. 2). Dieser Bereich wurde in 1000facher Vergrößerung dokumentiert und qualitativ ausgewertet.

Die lichtmikroskopische Analyse sollte die qualitative Bewertung der oberflächlichen Veränderungen und der Verschlussrate der Tubuli im geätzten und ungeätzten Dentin ermöglichen. Dazu wurde ein Scoringssystem mit folgender Klassifizierung eingeführt:

- +: Einlagerungen in Tubuli erkennbar, die Oberfläche weist einen Film oder Ausfällungen auf
- 0: keine Einlagerungen, keine Auflagerungen

In der Vorversuchsreihe sind exemplarisch Prüfkörper aus jeder Gruppe rasterelektronenmikroskopisch untersucht worden. Die Prüfkörper wurden auf REM Probetellern (Fa. Plano) fixiert und die

Schmelz-Zement-Grenze beidseitig mit Kohlenstoffstreifen markiert. Die Präparate wurden mit Kohlenstoff sputterbeschichtet. Für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung wurde ein XL 30 ESEM FEI 200 Rasterelektronenmikroskop genutzt (FEI Company) (Abb. 3).

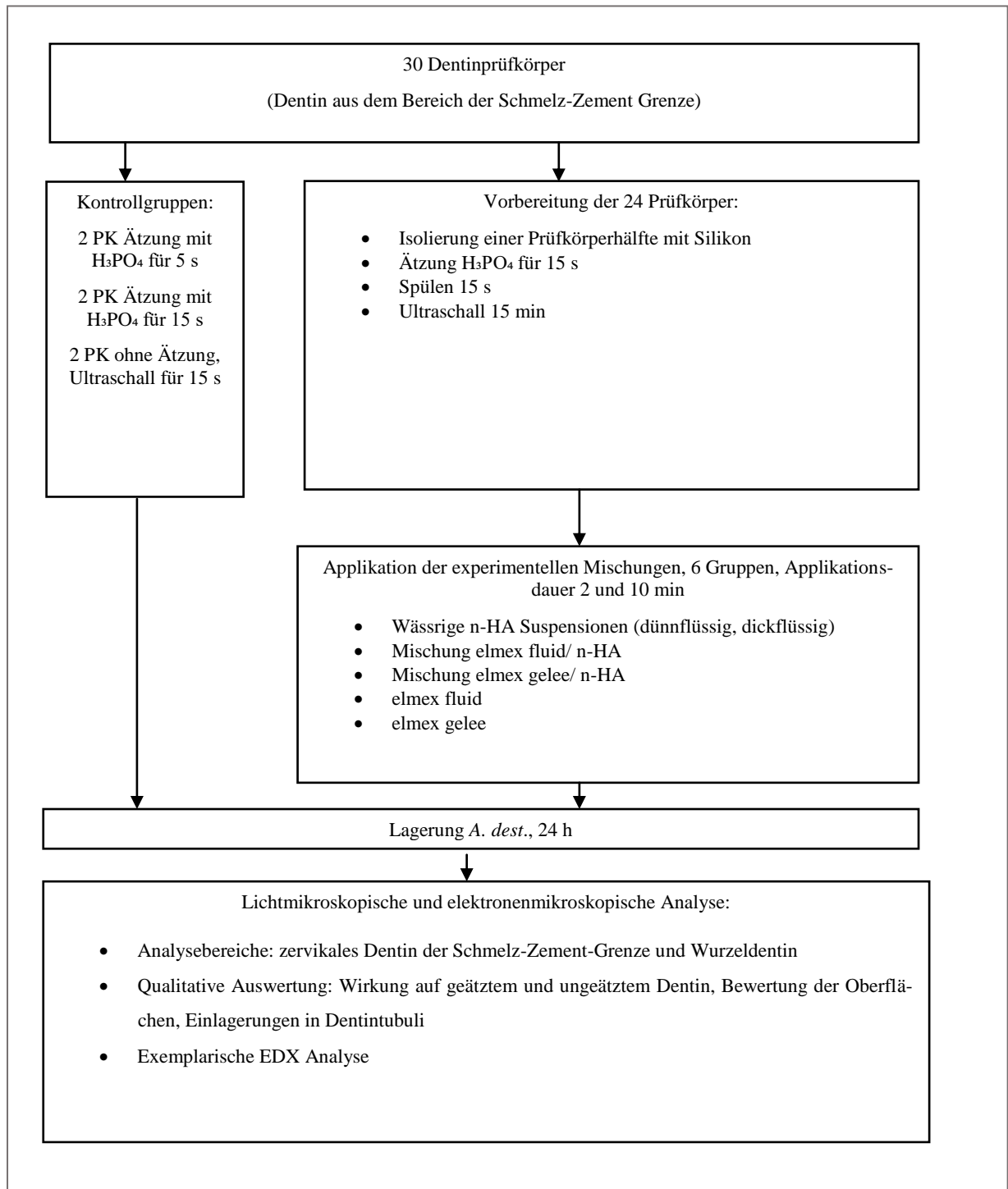


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Vorversuche

## 4 Hauptversuch

### 4.1 Gruppeneinteilung Hauptversuch

Zur Zubereitung einer wässrigen Hydroxylapatit-Suspension wurde nano-Hydroxylapatit (Kalident) mit destilliertem Wasser gemischt. Die zu untersuchenden Mischungen ergaben sich aus den Ergebnissen der Vorversuche (Tab. 2). Um eine Vergleichbarkeit der experimentell hergestellten nano-Hydroxylapatit Mischungen und Suspensionen mit dem kommerziell erhältlichen Mittel zu ermöglichen, sind im Hauptversuch alle Mittel einmalig für 2 min aufgetragen worden. Bei allen zu untersuchenden Mitteln erfolgte die Applikation mit einem Mikrobrush.

Es wurden zufällig drei Gruppen mit 6 Prüfkörpern gebildet, als Negativkontrolle wurden 2 Prüfkörper unbehandelt belassen (Abb. 4). Appliziert wurde jeweils für 2 min eine wässrige Suspension von nano-Hydroxylapatit (0,2 ml H<sub>2</sub>O, 0,1 mg n-HA), elmex fluid und eine experimentelle Mischung von elmex fluid mit nano-Hydroxylapatit (0,2 ml, 0,2 mg). Nach der Applikation sind die Prüfkörper in Wasser geschwenkt worden.

*Tabelle 2: Übersicht über die Gruppeneinteilung und der applizierten Agenzien. In jeder Gruppe wurden 6 Prüfkörper verwendet, in der Referenzgruppe 2 Prüfkörper, Applikationsdauer bei allen Gruppen 2 min*

| <b>Codierung</b>                       | <b>Aufgebrachtes Agenz</b>                               | <b>Zusammensetzung</b>   |
|--|--|--|
| E 1- E 6<br>(Positiv Kontrolle)        | elmex fluid  | 100 Gramm der Lösung enthalten 1,150 g Decafluor und 12,126 g Olafluor.          |
| nHA 1-nHA 6                            | Wässrige<br>Suspension nano Hydroxylapatit               | 0,2 ml <i>A.dest.</i><br>0,1 mg Kalident (Kalichem Italia Srl, Rezzato, Italien) |
| nHA_E 1-nHA_E 6                        | Experimentelle Mischung elmex fluid/ nano Hydroxylapatit | 0,2 ml elmex fluid<br>0,2 mg Kalident (Kalichem Italia Srl, Rezzato, Italien)    |
| Ref 1 und Ref 2<br>(Negativ Kontrolle) | ohne   | ohne   |



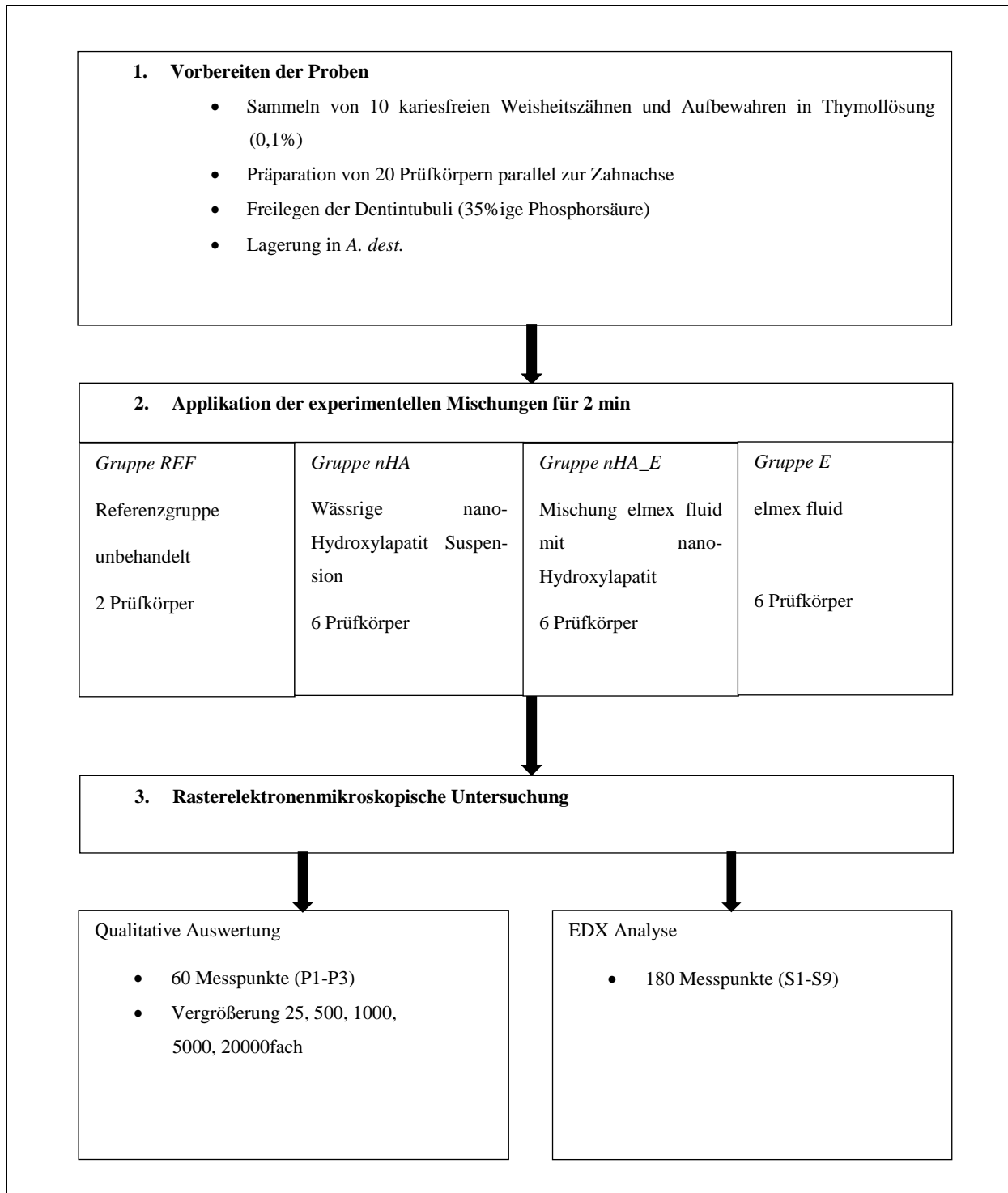


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung

#### 4.1.1 Rasterelektronenmikroskopie und Elementanalyse

Zielparameter in der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung waren die Elementzusammensetzung und die Qualität der aufgelagerten und der in die Tubuli eingelagerten Präzipitate. Nach den Ergebnissen der Vorversuche wurde die Zusammensetzung der Ausfällungen an drei verschiedenen Positionen der Prüfkörper untersucht (P 1-P 3). Ein Kohlenstoffstreifen diente zur Markierung der Schmelz-Zement Grenze (Abb. 5). Im Grenzbereich zwischen geätzter und nicht geätzter Fläche wurde etwa 1-1,5 mm davon entfernt in Richtung der Kohlenstoffmarkierung der erste Messpunkt (P 1) aufgesucht. Der zweite Messpunkt lag etwa 1-1,5 mm apikal davon (P 2). Als Kontrollmessung erfolgte eine Analyse im nicht geätzten Bereich (P 3). Die Areale wurden in 25, 500, 1000, 5000, 10000, 20000facher Vergrößerung festgehalten.

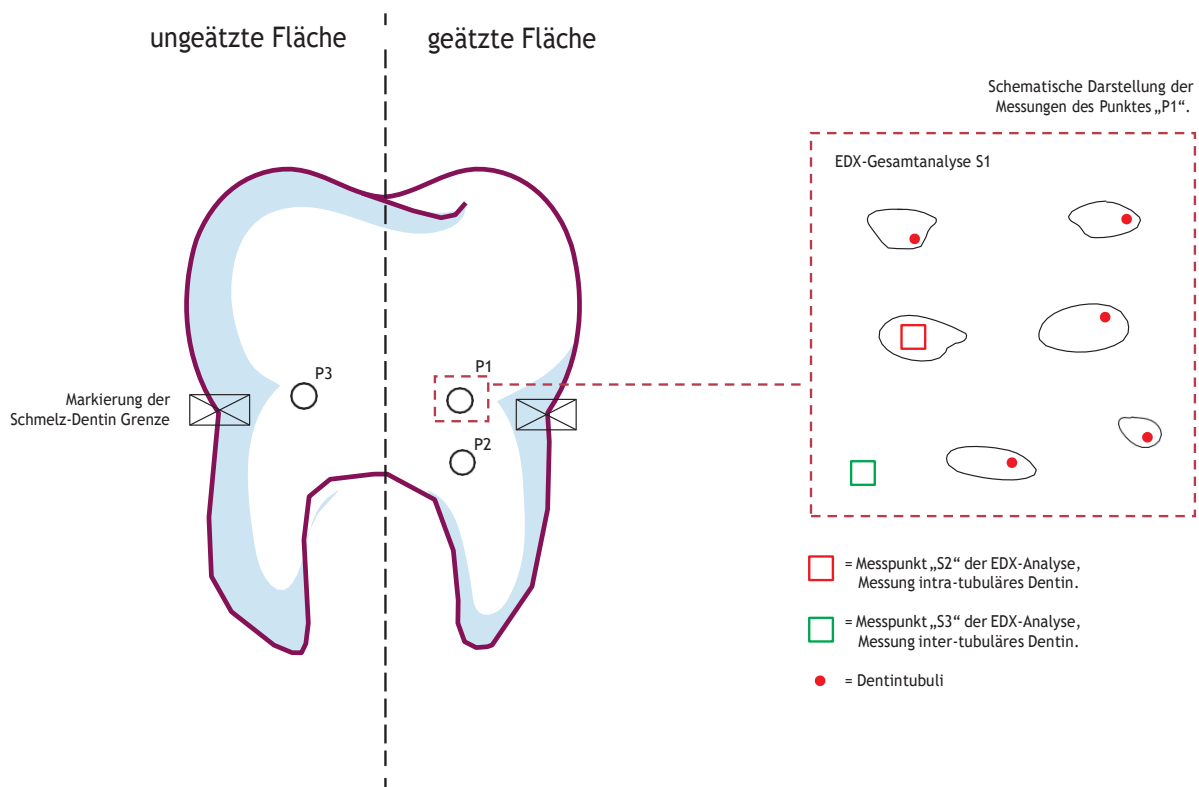


Abbildung 5: Schematische Darstellung der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung und der Messpunkte der EDX Analyse; die Messpunkte P1-P 3 sind links schematisch dargestellt, die Ausschnittsvergrößerung (rot gestrichelt) zeigt die Fläche der EDX Gesamtanalyse (S 1), die rote Markierung den intratubulären (S 2) und die grüne Markierung den intertubulären Messpunkt (S 3).

Zusätzlich wurde bei jeder Position drei Elementanalysen durchgeführt. Gemessen wurde die Gesamtzusammensetzung (S 1, S 4, S 7), die intratubuläre Einlagerung (S 2, S 5, S 8), sowie die intertubuläre Auflagerung (S 3, S 6, S 9). Die Analyse der Elemente wurde als atomarer Anteil (At%) und Gewichtsanteil (wt%) erfasst (Abb. 6).

Die Verteilungen sind für alle Präparate tabellarisch zusammengefasst worden. Die prozentualen Gewichtsanteile der Elemente Fluor, Calcium und Phosphor an den drei Messpunkten S 1-S 9 wurden grafisch dargestellt. Das Verhältnis von Phosphor zu Calcium an den Messpunkten wurde dokumentiert.

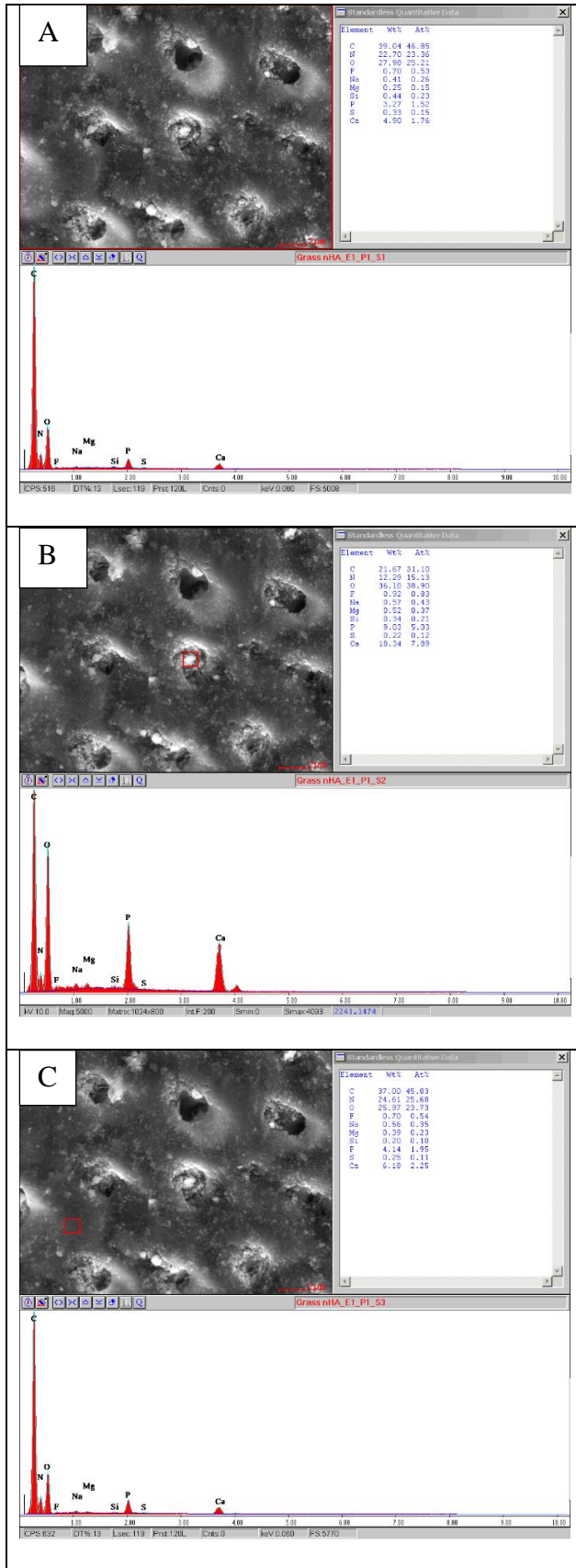


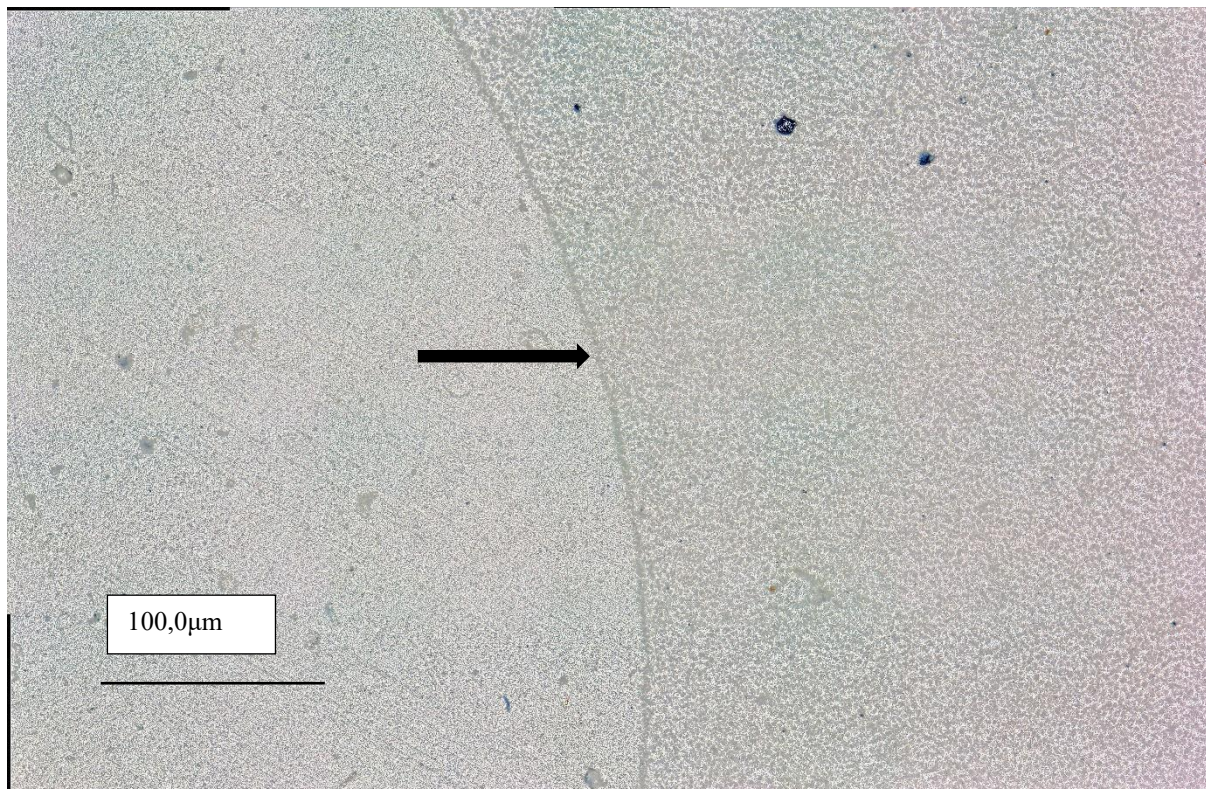
Abbildung 6: Darstellung der EDX Analyse des Präparates nHA\_E1, Applikation einer experimentellen Mischung von elmex fluid mit n-HA; A: Messpunkt S 1 (gesamte Fläche), B: Messpunkt S 2, Messung der intratubulären Einlagerung (rotes Kästchen) und C: intertubuläre Auflagerung (rotes Kästchen)

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Vorversuch

#### 5.1.1 Lichtmikroskopie

Um erste Aussagen zur Wirkung der aufgetragenen Agenzien und experimentellen Mischungen auf die Zahnhalsregion treffen zu können, musste die Vorbereitung der Prüfkörper sicherstellen, dass dieser Bereich bei der lichtmikroskopischen Untersuchung reproduzierbar aufzufinden ist. Zudem musste gewährleistet sein, dass die Dentintubuli eröffnet sind, um eine Obliteration durch die Applikation der experimentellen Mischungen nachweisen zu können. Der auszuwertende Bereich sollte lichtmikroskopisch und rasterelektronenmikroskopisch erfassbar sein. Daher erfolgte eine Markierung der Schmelz-Zement-Grenze im zur Fixierung der Prüfkörper genutzten Silikonblock (Abb. 2). Entlang dieser Markierung wurde in den Prüfkörpern der Grenzbereich zwischen geätzter und nicht geätzter Fläche aufgesucht (Abb. 7). Die makroskopisch erkennbare Grenze zwischen geätztem und ungeätztem Bereich ließ sich in der lichtmikroskopischen Analyse eindeutig feststellen (Abb. 7, Pfeilmarkierung). Damit konnte der für die Entstehung von Dentinhypersensibilitäten relevante Zahnhalsbereich aufgesucht und qualitativ ausgewertet werden. Die Konditionierung der freigelegten Dentinfläche mit Phosphorsäure führte zu einer Eröffnung der Dentintubuli. Im nicht geätzten, nur mit Ultraschall vorbehandelten Areal, konnten lichtmikroskopisch keine offenen Tubuli nachgewiesen werden. Die durch den Schleifprozess entstandene Schmierschicht wurde durch das Ultraschallbad nicht gelöst.



*Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Dentinfläche in 1000facher Vergrößerung, die rechte Seite wurde für 15 s mit 35%iger Phosphorsäure konditioniert, die linke Seite wurde vor der Ätzung mit einem dünnfließenden Silikonabformmaterial (Honigum-Light, Fa. DMG) isoliert. Dargestellt ist die Grenze zwischen geätztem und ungeätztem Bereich (Pfeilmarkierung). Die Tubuli sind in der geätzten Fläche kreisrund dargestellt, in der ungeätzten Fläche sind Schleifspuren zu erkennen.*

Im Bereich der Schmelz-Zement-Grenze wurden bei einer Applikationsdauer von 2 min in der ungeätzten Fläche bei allen aufgetragenen Agenzien Auflagerungen detektiert, in der geätzten Fläche waren bei der dünnflüssigen n-HA-Mischung und bei elmex fluid bei jeweils einem Prüfkörper keine Auflagerungen zu erkennen (Tab. 3). Die Verlängerung der Applikationszeit auf 10 min führte zu keiner Verbesserung der Ergebnisse. Es waren sowohl bei den wässrigen n-HA-Suspensionen als auch bei der Mischung von n-HA mit elmex fluid Prüfkörper ohne Auflagerungen in der geätzten und ungeätzten Fläche festzustellen (Tab. 4). Auffallend war bei der längeren Applikationszeit, dass bei der dickflüssigen wässrigen Mischung von n-HA bei 4 Prüfkörpern keine Auflagerungen lichtmikroskopisch erkennbar waren. Bei der dünnflüssigen Mischung wurden qualitativ ähnliche Effekte unabhängig von der Applikationszeit festgestellt (Abb. 8, Abb. 9). Bei der durchgeführten lichtmikroskopischen Analyse ließ sich nicht eindeutig feststellen, welcher Art diese Präzipitate waren. Daher wurde aus jeder Gruppe im Vorversuch ein Prüfkörper zufällig ausgewählt und rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Auflagerungen wurden mittels EDX analysiert.

*Tabelle 3, lichtmikroskopische Analyse: Darstellung der qualitativen Ergebnisse bei 2-minütiger Applikationszeit, „+“ Auflagerungen erkennbar, „0“ nicht erkennbar, bewertete Areale sind die Dentinflächen der Schmelz-Zement-Grenze und des Wurzel dentins, jeweils geätzt mit Phosphorsäure und ungeätzt*

| Applikationsdauer<br>2min | Dentin der Schmelz-Zement-<br>Grenze |        | Wurzel dentin |        |
|---------------------------|--------------------------------------|--------|---------------|--------|
|                           | ungeätzt                             | geätzt | ungeätzt      | geätzt |
| Appliziertes<br>Mittel    |                                      |        |               |        |
| nHa-E                     | +                                    | +      | +             | +      |
|                           | +                                    | +      | +             | +      |
| E_F                       | +                                    | +      | 0             | 0      |
|                           | +                                    | 0      | +             | 0      |
| E_G                       | +                                    | +      | +             | +      |
|                           | +                                    | +      | +             | +      |
| nHA dickfl.               | +                                    | +      | +             | +      |
|                           | +                                    | +      | +             | +      |
| nHA dünnfl.               | +                                    | +      | +             | +      |
|                           | +                                    | 0      | 0             | +      |

Tabelle 4, lichtmikroskopische Analyse: Darstellung der qualitativen Ergebnisse bei 10-minütiger Applikationszeit, „+“ Auflagerungen erkennbar, „0“ nicht erkennbar, bewertete Areale sind die Dentinflächen der Schmelz-Zement-Grenze und des Wurzelzements, jeweils geätzt und ungeätzt mit Phosphorsäure

| Applikationsdauer<br>10 min | Dentin der Schmelz-Zement-Grenze |        | Wurzelzement |        |
|-----------------------------|----------------------------------|--------|--------------|--------|
|                             | ungeätzt                         | geätzt | ungeätzt     | geätzt |
| Appliziertes Mittel         |                                  |        |              |        |
| nHa-E                       | 0                                | +      | +            | +      |
|                             | 0                                | 0      | +            | +      |
| E_F                         | +                                | +      | +            | +      |
|                             | +                                | +      | +            | +      |
| E_G                         | +                                | +      | +            | +      |
|                             | +                                | 0      | 0            | 0      |
| nHA dickfl.                 | 0                                | 0      | 0            | 0      |
|                             | +                                | +      | +            | +      |
| nHA dünnfl.                 | +                                | +      | +            | +      |
|                             | 0                                | 0      | 0            | +      |

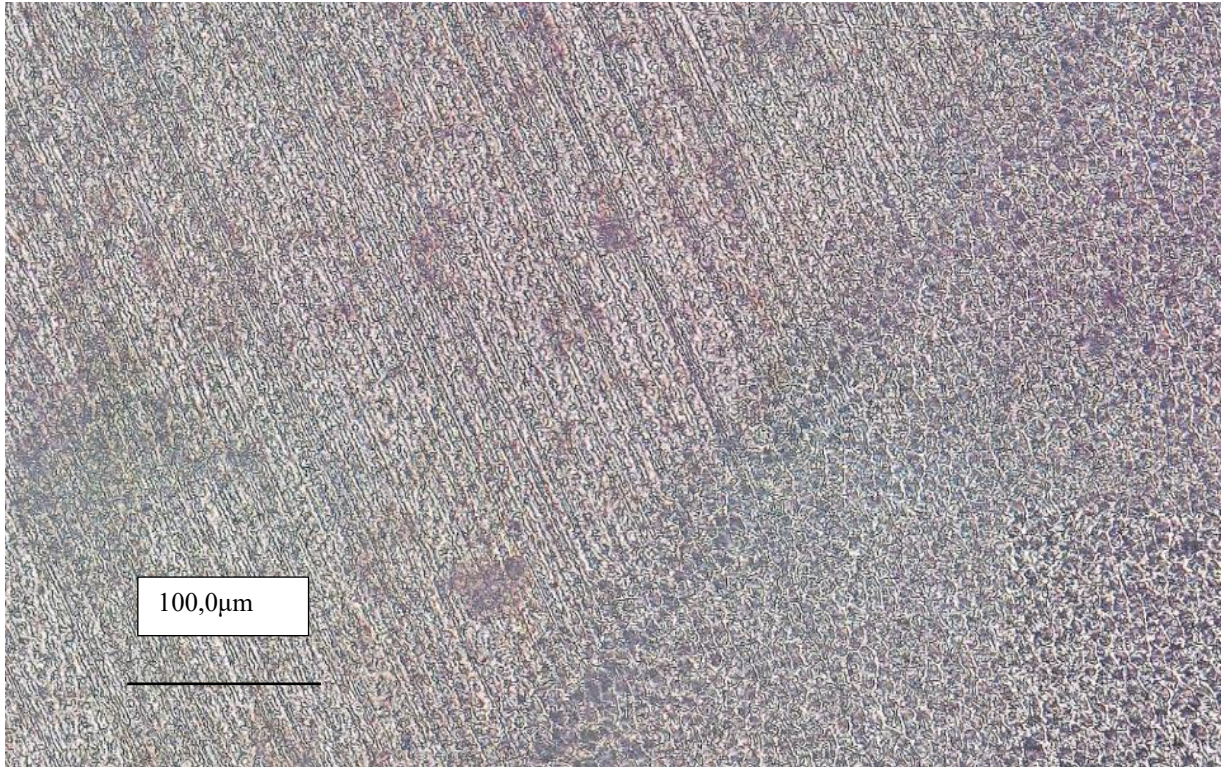




*Abbildung 8: Exemplarische lichtmikroskopische Darstellung einer Wurzeldentinfläche, in 1000facher Vergrößerung, das Wurzeldentin konditioniert mit 35%iger Phosphorsäure (rechts), Applikation einer Mischung von elmex fluid und Kalident, Applikationsdauer 2min; im nicht geätzten Areal (links) sind keine Tubuli zu erkennen, es zeigen sich Schliffspuren, im geätzten Areal (rechts) erscheinen die kreisrund angeschnittenen Tubuli mit Einlagerungen.*

Es konnten bei den im Vorversuch gewählten Bedingungen keine oder nur geringe Unterschiede bei der Veränderung der Applikationsdauer festgestellt werden. Eine längere Einwirkzeit scheint bei den experimentellen nano-Hydroxylapatit Mischungen keinen Einfluss auf die Qualität der Tubulusverschlüsse zu haben (Abb. 9). Daher ist für den Hauptversuch eine klinisch zu realisierende Applikationsdauer von 2 min gewählt worden.

Die lichtmikroskopische Analyse war geeignet, in der Fläche die Verschlüsse der Dentin-tubuli orientierend zu bewerten. Die angewandte 1000fache lichtmikroskopische Vergrößerung erlaubte eine qualitative Bewertung der applizierten Mittel. Bewertet wurden der Bereich der Schmelz-Zement-Grenze und das apikal davon liegende Wurzeldentin in der geätzten und ungeätzten Fläche. Zur lichtmikroskopischen Untersuchung mussten die Proben nicht weiter vorbehandelt werden. Das gewählte Scoringssystem erlaubte eine erste Bewertung zur tubulusokkludierenden Wirkung der experimentellen Mischungen.



*Abbildung 9: Exemplarische lichtmikroskopische Darstellung einer Dentinfläche, in 1000facher Vergrößerung, Dentin auf Höhe der Schmelz-Zement Grenze, konditioniert mit 35%iger Phosphorsäure (rechts), Applikation einer Mischung von elmex fluid mit Kalident, Applikationsdauer 10 min; ungeätzter Bereich links, rechts im geätzten Bereich sind teilweise verschlossene Tubuli und Einlagerungen in den Tubuli feststellbar, die linke (ungeätzte) Fläche ist maskiert mit ungleichmäßig begrenzten Auflagerungen*

### 5.1.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung eines unbehandelten Prüfkörpers im Vorversuch zeigte, dass durch die Präparationsart und Vorbehandlung mit Phosphorsäure die Tubuluseingänge darstellbar waren (Abb. 10). In der nicht geätzten Fläche sind die Tubuli in Umrissen verschlossen erkennbar gewesen und durch die Behandlung im Ultraschallbad nicht eröffnet worden.

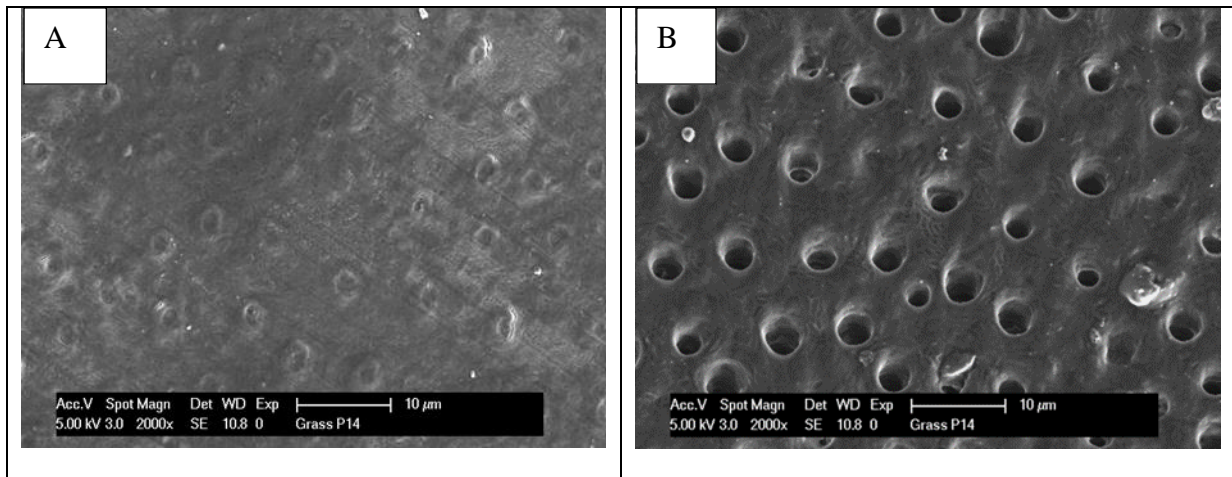


Abbildung 10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Dentin der Zahnhalsregion, Referenzprobe aus Vorversuch; der Prüfkörper ist mit 35%iger Phosphorsäure vorbehandelt worden (B). Dargestellt ist die mit Abformsilikon abgedeckte Vergleichsfläche (A). In der vor der Ätzung abgedeckten Fläche des Prüfkörpers (A) sind die Tubuluseingänge in Umrissen erkennbar und komplett verschlossen, nach Ätzung der Fläche für 15 s mit Phosphorsäure erscheint die Dentinoberfläche geglättet und die Tubuluseingänge sind rund dargestellt (Vergrößerung 5000fach).

Bei der Verwendung der kommerziell erhältlichen Fluoridpräparate bildeten sich, unabhängig von der Applikationsdauer, keine oder nur geringe Ausfällungen von Fluorid-Globuli. Es war kein Tubulusverschluss feststellbar (Abb. 11, E und F.) Die Mischungen von n-HA mit elmex fluid zeigten unter den Bedingungen des Vorversuches Auflagerungen auf der gesamten Dentinfläche (Abb. 11, D). Daher ist diese experimentelle Mischung im Hauptversuch weiter untersucht worden. Bei unterschiedlicher Applikationsdauer ließ sich in der rasterelektronenmikroskopischen 20000fachen Vergrößerung kein qualitativer Unterschied in der Art und Ausbildung der Präzipitate bei der dünnflüssigen experimentellen nano-Hydroxylapatit Mischung feststellen (Abb. 12). Es zeigten sich bei beiden Applikationszeiten partikuläre Einlagerungen an der Tubuluswand und am Eingang dichtere Auflagerungen. Die Dentinoberfläche war mit amorphen Ausfällungen bedeckt.

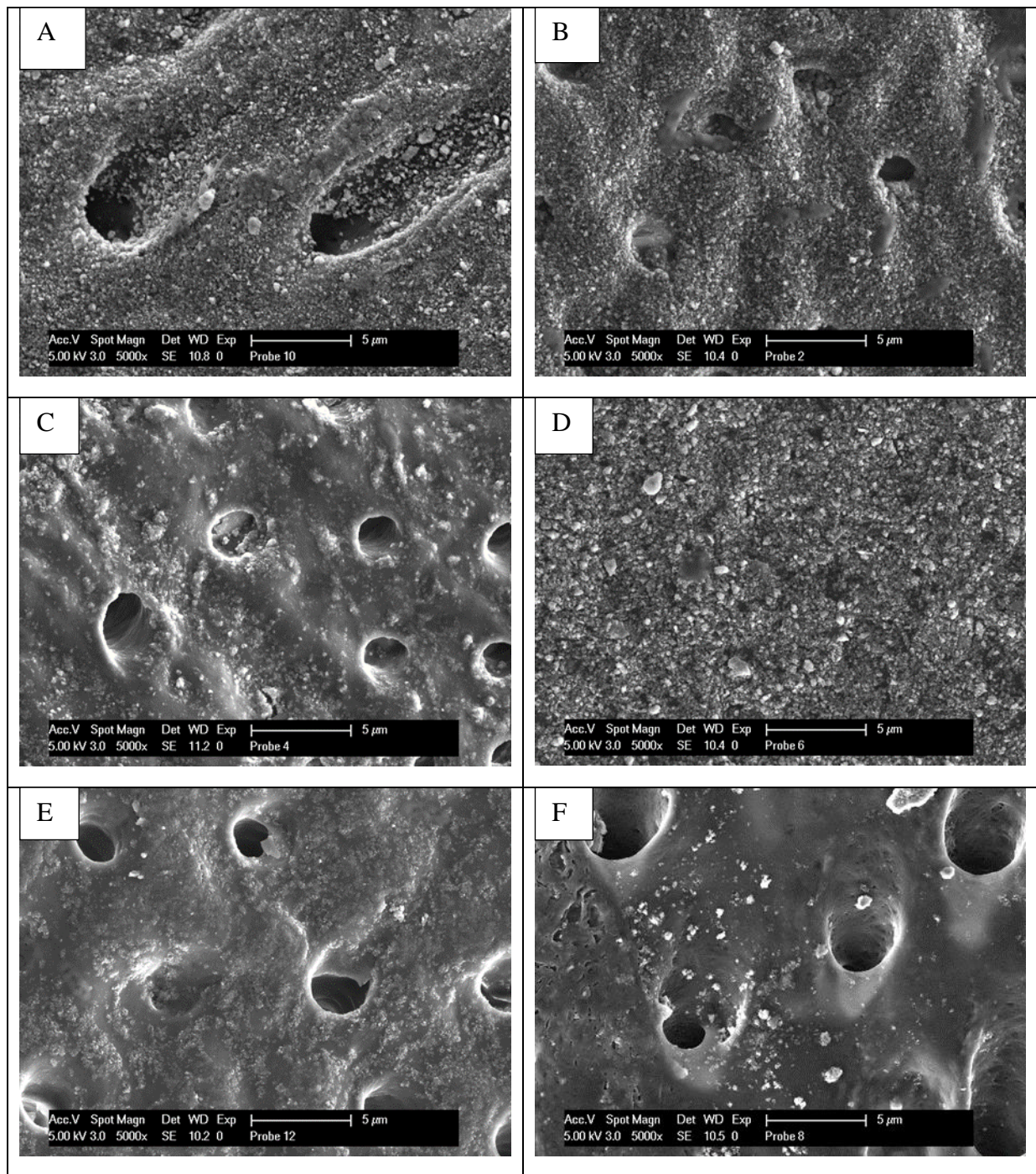


Abbildung 11: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Dentinoberflächen bei 5000facher Vergrößerung, Konditionierung der Oberflächen mit 35%iger Phosphorsäure, die Applikationsdauer betrug 10 min; A: Applikation einer dünnflüssigen Suspension von nano-Hydroxylapatit, in den schräg angeschnittenen Tubuli sind Einlagerungen zu erkennen, die Oberfläche ist mit Ausfällungen bedeckt, B: dickflüssige nano-Hydroxylapatit Suspension appliziert, die Tubuli erscheinen teilweise verschlossen, die Dentinoberfläche ist bedeckt, C: Mischung elmex gelee mit nano-Hydroxylapatit, offene Tubuli und unregelmäßige Ausfällungen auf dem Dentin, D: Mischung nano-Hydroxylapatit mit elmex fluid, die Oberfläche zeigt amorphe unstrukturierte Auflagerungen, Tubuli sind nicht erkennbar, E: aufgebracht wurde elmex gelee, die Tubuli sind offen dargestellt, Einlagerungen sind nicht erkennbar, kleine globuläre Auflagerungen auf der Dentinfläche, F: Anwendung von elmex fluid, die Tubuli sind offen dargestellt, partikuläre Auflagerungen auf der Dentinfläche.

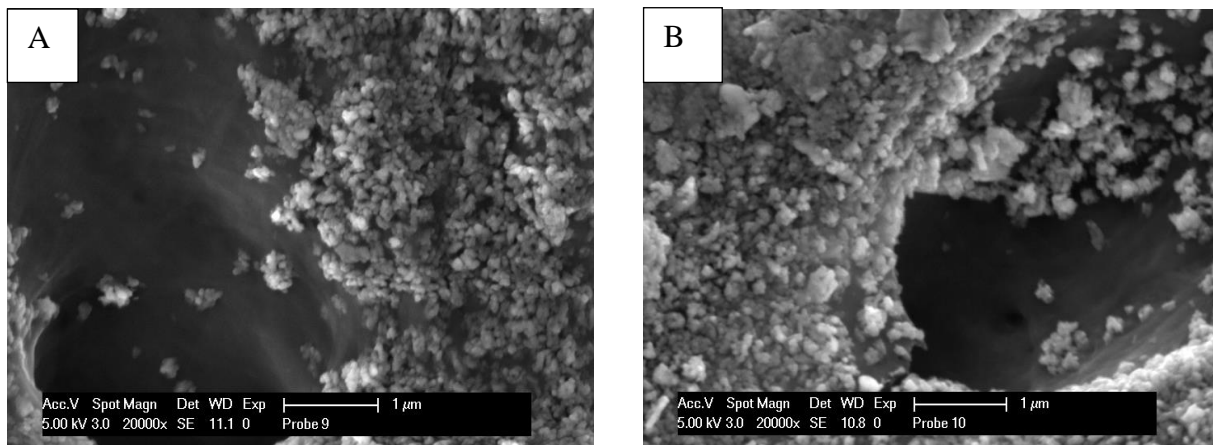


Abbildung 12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Dentintubuli in 20000facher Vergrößerung, Konditionierung der Oberfläche mit 35%iger Phosphorsäure, Applikation von dünnflüssiger nano-Hydroxylapatit Suspension; A: bei einer Applikationsdauer von 2 min sind vereinzelte kleine partikuläre Einlagerungen an der Tubuluswand erkennbar, am Eingang dichtere Auflagerungen, B: bei einer Applikationsdauer von 10 min, sind Einlagerungen im Tubulus erkennbar, die Dentinoberfläche ist mit amorphen Ausfällungen bedeckt.

Bei in-office Präparaten werden die Präparate mit Pinseln, Wattekugeln oder Mikrobrushes aufgebracht. Die Applikation der experimentellen Mischungen im Vorversuch erfolgte entsprechend der Herstellerangabe des kommerziell erhältlichen Mittels. Die Vorversuche zeigten keine Unterschiede in der Wirkung in Abhängigkeit von der Applikationsdauer. Das Absprühen der behandelten Prüfkörper mit dem Luft-Wasser Spray einer Dentaleinheit als worst case Szenario konnte ebenfalls keine Unterschiede in der Wirkung hervorrufen. Im Hauptversuch ist daher die Behandlung der Prüfkörper aus dem Vorversuch übernommen worden, die Prüfkörper wurden nach der Applikation in Wasser geschwenkt. Die Applikationsdauer wurde der klinisch relevanten Zeit von 2 min angepasst.

## 5.2 Hauptversuch

### 5.2.1 Qualitative Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung

Die rasterelektronenmikroskopische exemplarische Darstellung des Prüfkörpers E 1 zeigt die Wirkung von elmex fluid auf die durch die Ätzung mit Phosphorsäure vorbehandelten Dentinfläche (Abb. 13). Die Tubuli sind durch die Ätzung eröffnet worden und wurden nach 2-minütiger Applikation von elmex fluid nicht verschlossen (Messpunkte P 1 und P 2). Bei der 20000fachen Vergrößerung lassen sich globuläre Anhäufungen auf der Dentinfläche in unregelmäßiger Verteilung feststellen (Abb. 13, G und H). Verschlussene Tubuli sind in der nicht geätzten Fläche vorhanden, die Umriss der Tubuli sind dabei erkennbar (Messpunkt P 3). Die exemplarische Darstellung zeigt bei 1000facher Vergrößerung eine ähnliche Anzahl von Tubuli in der Fläche und vergleichbare Durchmesser der Tubuli an Messpunkten P 1, P 2 und P 3 (Abb. 13, A, B und C).

Sowohl die Anzahl der Tubuli als auch deren Durchmesser ähneln sich unabhängig von der Lokalisation im Dentin. Bei den Prüfkörpern der Gruppe E wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen bei allen Prüfkörpern kein Verschluss der durch die Vorbehandlung mit Phosphorsäure eröffneten Dentintubuli erreicht. Die intertubuläre Fläche erscheint dabei geglättet (Abb. 13, D und E).

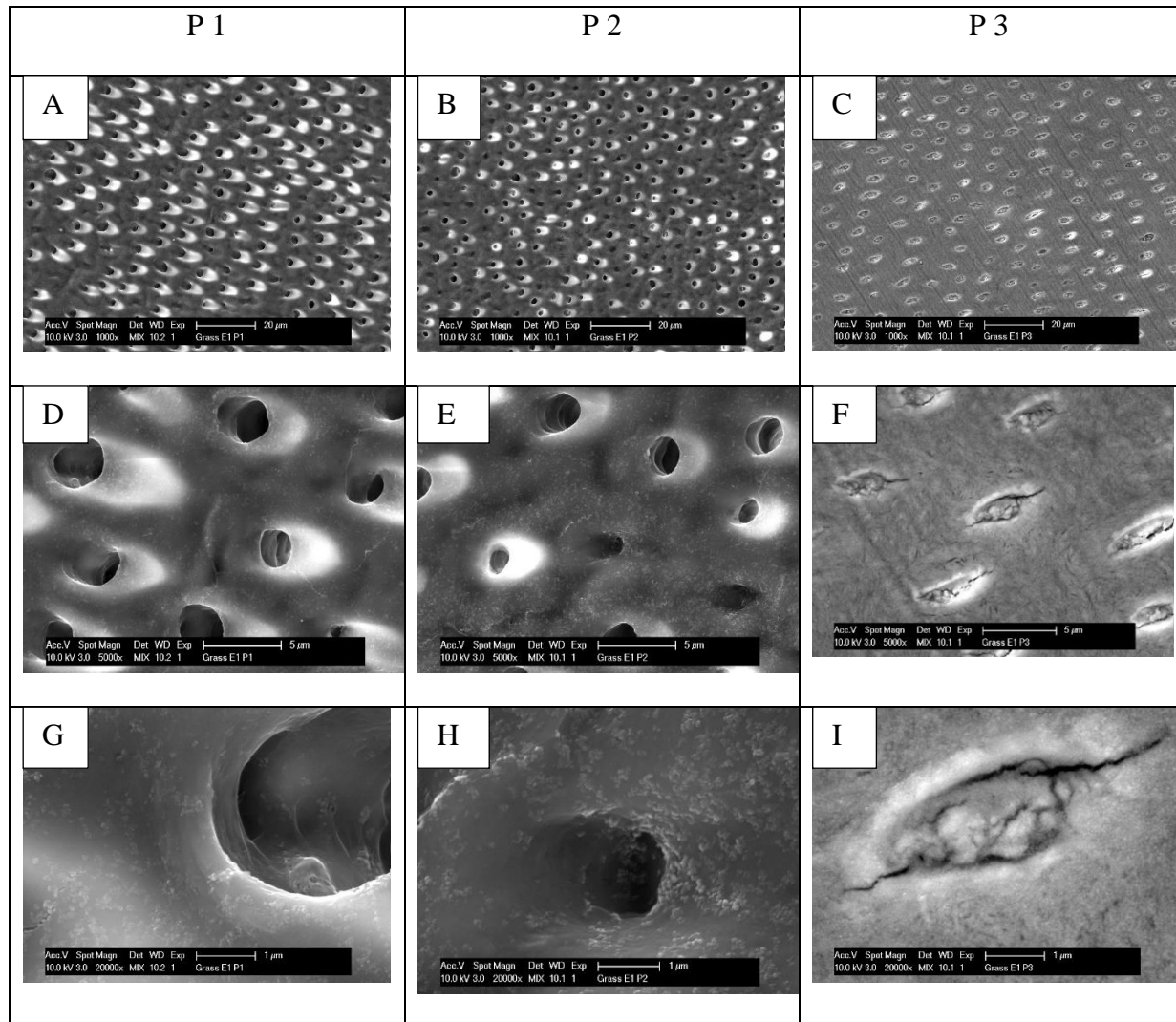


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung eines Prüfkörpers nach Applikation von *elmex fluid* für 2 min (Prüfkörper E 1), an den Messpunkten P1 linke Spalte, P2 mittlere Spalte und P3 rechte Spalte, in der Vergrößerung 1000fach (obere Reihe), 5000fach (mittlere Reihe) und 20000fach (untere Reihe). In der Fläche bei P 1 und P 2 (A, B, D, E) sind keine Tubulusverschlüsse zu erkennen. Die intertubuläre Fläche erscheint geglättet (D und E). In der 20000fachen Vergrößerung geringe globuläre Auflagerungen in unregelmäßiger Verteilung (G und H); bei P 3 erscheinen die Tubuli mit Einlagerungen und in Umrissen erkennbar (C, F, I).

In der Gruppe n-HA\_E sind bei allen Prüfkörpern, unabhängig vom Messpunkt in der geätzten Fläche, amorphe, globuläre Einlagerungen in die Tubuli zu erkennen. Dabei sind die Tubuli in Umrissen zu erkennen (Abb. 14). Die Applikation der experimentellen Mischung von elmex fluid und nano-Hydroxylapatit führte zu partikulären Einlagerungen in die Tubuli. Auf dem intertubulären Dentin sind dabei unregelmäßig geformte Auflagerungen unterschiedlicher Dimension erkennbar. Eine totale Maskierung der Oberfläche ist bei der Gruppe n-HA\_E bei den Messpunkten P 1 und P 2 nicht festzustellen. Die Qualität der Auflagerungen ähnelt sich im intertubulären Dentin bei allen Prüfkörpern. Somit kommt es zu oberflächlichen Ausfällungen, wenn n-HA mit elmex fluid gemischt appliziert wird (Abb. 14).

Im Gegensatz dazu konnte in der Gruppe n-HA bei zwei Präparaten eine komplette Maskierung der Oberfläche festgestellt werden (Abb. 15, Prüfkörper n-HA 3 und n-HA 6). Bei den weiteren Präparaten sind die Tubuluseingänge in Umrissen erkennbar, vereinzelt sind auch offene Tubuli vorhanden. Die Qualität der Auflagerungen unterscheidet sich im geätzten Dentin nicht von der Lokalisation des Messpunktes. Bei P 1 und P 2 sind die aufgelagerten und eingelagerten Partikel ähnlich (Abb. 15). Die Art des Dentins, koronales Dentin bei P 1 und eher radikuläres bei P 2, hat keinen Einfluss auf die Ausbildung der Auflagerungen in dieser Gruppe. Auf allen Prüfkörpern lagern sich Präzipitate ab. Unter den gewählten Versuchsbedingungen bilden sich bei der Anwendung einer wässrigen n-HA-Suspension Auflagerungen auf den mit Phosphorsäure vorbehandelten Dentinflächen.

In der n-HA\_E Gruppe und in der n-HA Gruppe sind die sich ähnelnde Auflagerungen sowohl im koronalen (Messpunkt P 1) als auch im radikulärem Dentin (Messpunkt P 2) detektierbar. Die Qualität der Ausfällungen ist unabhängig von der dokumentierten Stelle und Dentinart. Dagegen erscheinen nach der Applikation von elmex fluid nur kleinere, partikuläre Auflagerungen auf der Oberfläche und den Tubulusrändern, ein Tubulusverschluss ist nicht feststellbar (Abb. 16, Abb. 17). Unregelmäßig geformte Präzipitate auf der Dentinfläche und amorphe globuläre Einlagerungen in die Tubuli finden sich in ähnlicher Qualität bei beiden n-HA Gruppen. In der 20000fachen Vergrößerung sind bei beiden Gruppen vereinzelte, komplette Tubulusverschlüsse festzustellen. Die Tubuluseingänge sind in Umrissen erkennbar (Abb. 16, Abb. 17).

Die Darstellung des Messpunktes P 3 zeigt in der 20000fachen Vergrößerung einen versuchsgruppenübergreifenden Tubulusverschluss (Abb. 18). Allerdings erscheint nach der Applikation von n-HA und n-HA\_E die Oberfläche zum Teil maskiert (n-HA 2 und n-HA\_E 1, 2, 6, Abb. 18). Die Umrise der Tubuli sind in diesen Gruppen nicht erkennbar. Im Gegensatz dazu sind bei der Gruppe E im Dentin Schleifspuren erkennbar und die Umrise der Tubuli in allen Prüfkörpern nachweisbar (Abb. 18, Präparate E 1-6). Die Tubuli erscheinen in dieser Gruppe verschlossen, Auflagerungen auf das Dentin sind nicht zu erkennen.

| P 1 | P 2 | n-HA_E |
|-----|-----|--------|
|     |     | 1      |
|     |     | 2      |
|     |     | 3      |
|     |     | 4      |
|     |     | 5      |
|     |     | 6      |

Abbildung 14: Darstellung der Prüfkörper n-HA\_E 1-6, linke Spalte Messpunkt P1, rechte Spalte Messpunkt P2. Bei allen Prüfkörpern ergeben sich keine qualitativen Unterschiede, es zeigen sich amorphe, globuläre Einlagerungen in die Tubuli, die Tubuli sind in Umrissen zu erkennen. Die Qualität der Auflagerungen intertubulär unterscheidet sich nicht mit der Art des Dentins (Vergrößerung: 5000fach).



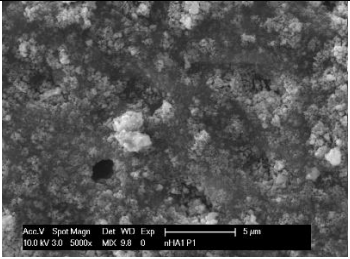
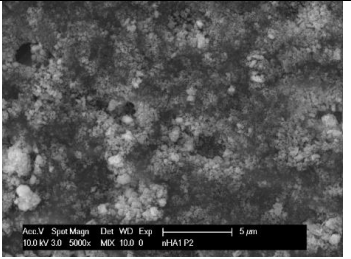
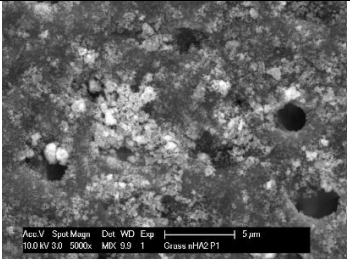
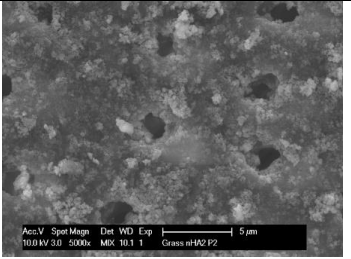
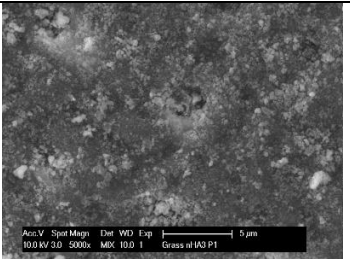
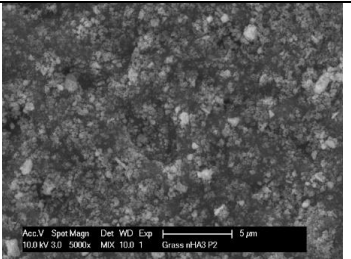
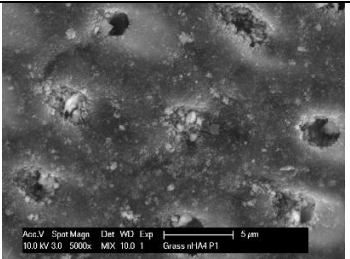
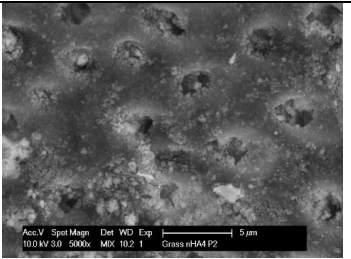
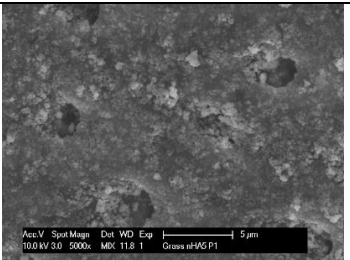
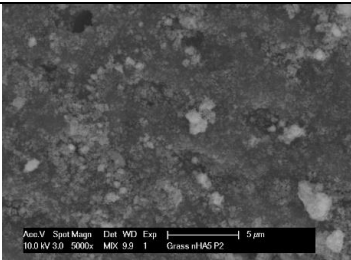
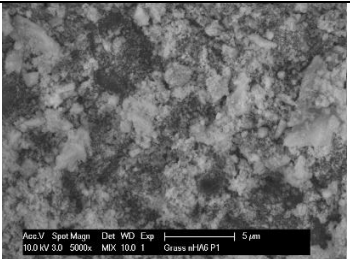
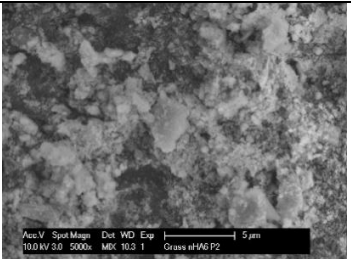
| P 1   | P 2   | n-HA |
|---|---|------|
|    |    | 1    |
|    |    | 2    |
|   |   | 3    |
|  |  | 4    |
|  |  | 5    |
|  |  | 6    |

Abbildung 15: Darstellung der Prüfkörper n-HA 1 bis n-HA 6. Linke Spalte Messpunkt P1, rechte Spalte Messpunkt P2. Die aufgelagerten und eingelagerten Partikel ähneln sich bei den Präparaten, unabhängig von der dokumentierten Stelle und Dentinart. Bei n-HA 3 und n-HA 6 ist bei beiden dokumentierten Punkten eine totale Maskierung der Oberfläche festzustellen (Vergrößerung: 5000fach).

| n-HA | n-HA_E | E | P 1 |
|------|--------|---|-----|
|      |        |   | 1   |
|      |        |   | 2   |
|      |        |   | 3   |
|      |        |   | 4   |
|      |        |   | 5   |
|      |        |   | 6   |

Abbildung 16: Darstellung der 6 Prüfkörper aller Gruppen am Messpunkt P1, Vergrößerung 20000fach; in der linken Spalte appliziert n-HA, mittlere Spalte Mischung n-HA\_E, rechte Spalte E. Bei n-HA und n-HA\_E sind unregelmäßig geformte Präzipitate auf der Dentinoberfläche und eingelagert in die Tubuli zu erkennen, die Tubuluseingänge sind in Umrissen erkennbar. Nach der Applikation von E sind die Eingänge erkennbar dargestellt, zum Teil zeigen sich kleine, partikuläre Auflagerungen auf der Oberfläche.

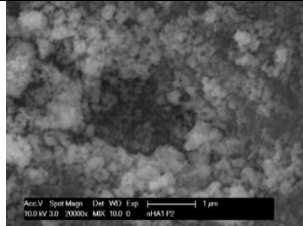
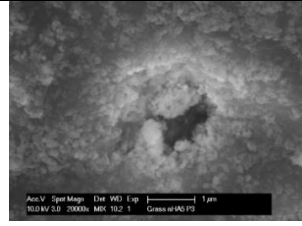
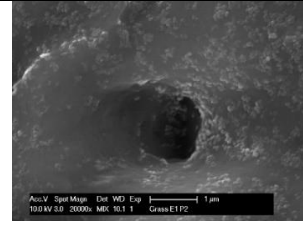
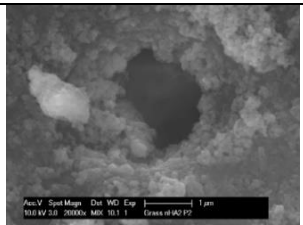
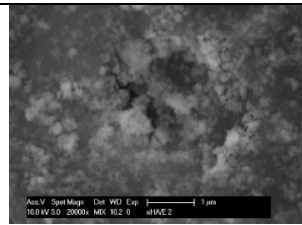
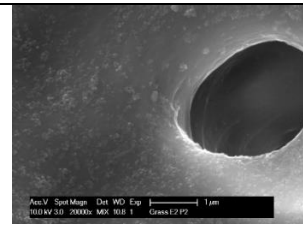
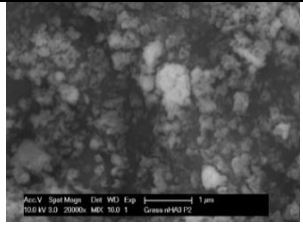
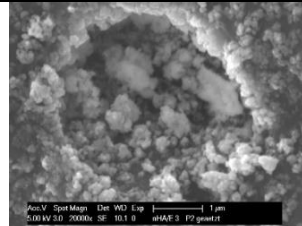
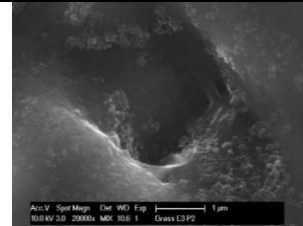
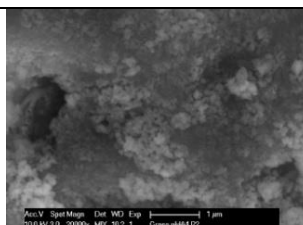
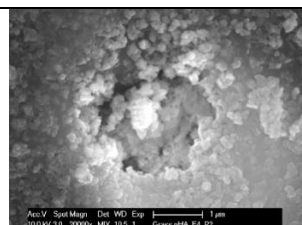
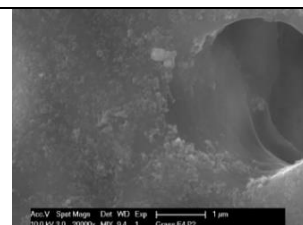
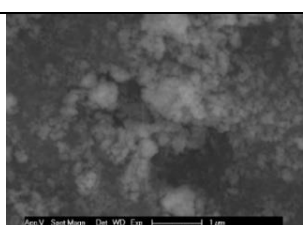
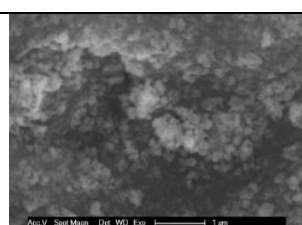
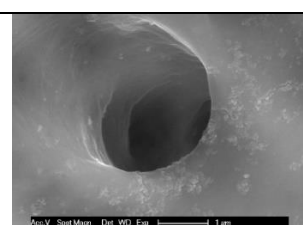
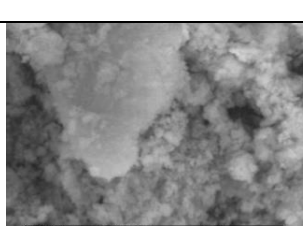
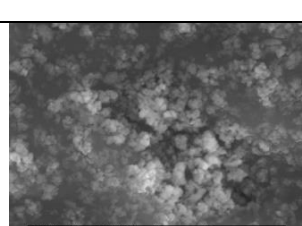
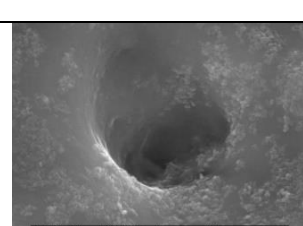
| n-HA  | n-HA_E  | E  | P 2 |
|---|---|--|-----|
|    |    |    | 1   |
|    |    |    | 2   |
|    |    |    | 3   |
|   |   |   | 4   |
|  |  |  | 5   |
|  |  |  | 6   |

Abbildung 17: Darstellung der 6 Prüfkörper aller Gruppen am Messpunkt P2, Vergrößerung 20000fach. In der linken Spalte n-HA appliziert, mittlere Spalte Mischung nHA\_E und rechte Spalte E. Nach der Applikation von E sind oberflächliche Globuli ohne Verschluss der Tubuluseingänge vorhanden, bei n-HA und nHA\_E sind Auflagerungen auf der Oberfläche mit teilweise kompletten Verschluss der Tubuluseingänge zu erkennen.

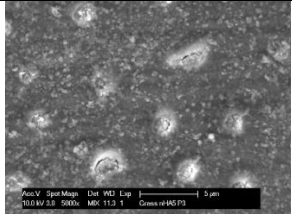
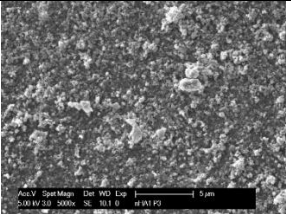

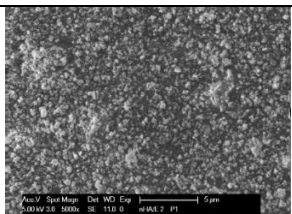
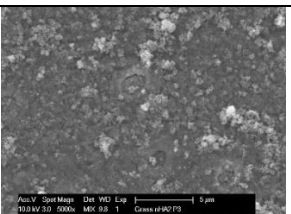
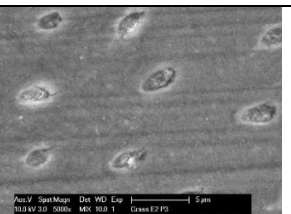
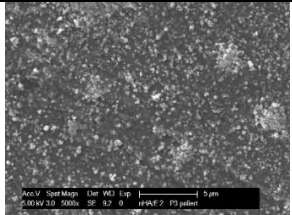

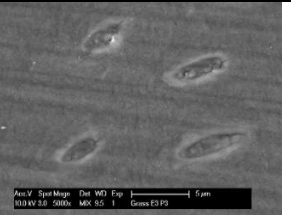
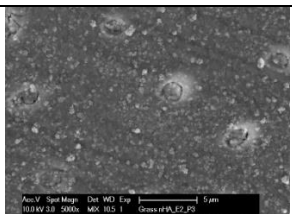
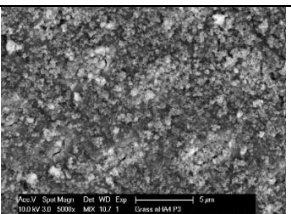
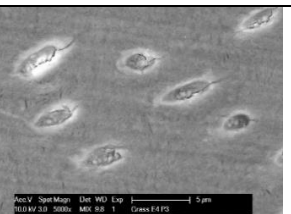
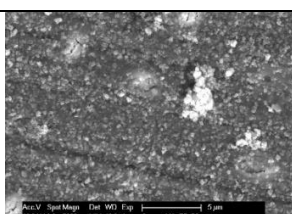
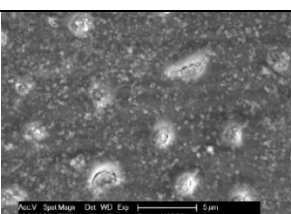
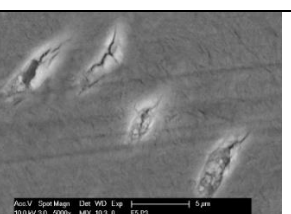
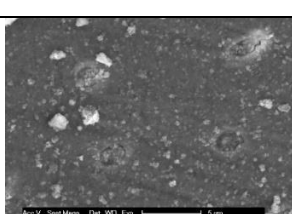
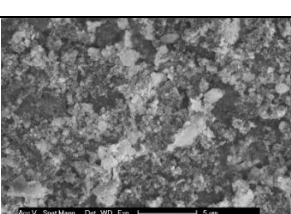
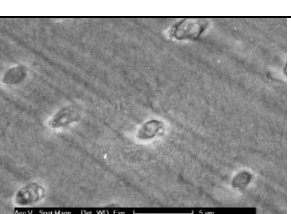
| n-HA  | n-HA_E  | E  | P 3 |
|---|---|--|-----|
|    |    |    | 1   |
|    |    |    | 2   |
|    |    |    | 3   |
|   |   |   | 4   |
|  |  |  | 5   |
|  |  |  | 6   |

Abbildung 18: Darstellung aller 6 Prüfkörper am Messpunkt P3, Vergrößerung 5000fach. In der linken Spalte n-HA appliziert, mittlere Spalte n-HA\_E, rechte E. Nach der Applikation von n-HA und E erscheint die Oberfläche zum Teil maskiert, die Tubuluseingänge sind vereinzelt in Umrissen erkennbar. Bei E ist die Oberfläche geglättet und die Tubuli mit einer durch das Schleifen entstandenen Schmierschicht verschlossen. Die Tubuli sind bei allen Präparaten der Gruppe E in Umrissen erkennbar.

## 5.2.2 Ergebnisse der Elementanalyse

Die Elementanalyse erfolgte an den 3 Messpunkten P 1-P 3 für die Gesamtfläche, intratubulär und intertubulär. Da die 2000fache Vergrößerung für die Prüfkörper der Gruppe E keine Einlagerungen in die Tubuli aufwies (Abb. 16, Abb. 17) ist diese Gruppe für die Darstellung der Calcium-Phosphor-Verhältnisse bei den intratubulären Messpunkten unberücksichtigt geblieben. Für die Gruppen n-HA und n-HA\_E sind die Messwerte bei den intratubulären Messpunkten S 2 und S 5 tabellarisch erfasst worden und das Verhältnis wurde dokumentiert (Tab. 5, Tab. 6). Bei dem Prüfkörper n-HA 6 ist keine Messung möglich gewesen, da die Dentinfläche komplett maskiert und die Tubuli auch in Umrissen nicht zu erkennen waren (Abb. 15). Es ergaben sich in der n-HA Gruppe intratubulär Werte für Calcium zwischen 13,39 und 41,86 wt%, für Phosphor von 7,50 bis 19,87 wt%. Das entsprach in dieser Gruppe einem Ca/P Verhältnis von 1,79 bis 2,31 wt%. Für die Gruppe n-HA\_E ergab sich ein Ca/P Verhältnis von 1,91 bis 2,25 wt%, bei Schwankungen für Calcium von 13,16 bis 44,07 wt% und bei Phosphor von 6,34 bis 20,84 wt%.

*Tabelle 5: Messwerte der intratubulären EDX Analyse (Messpunkte S 2 und S 5) für die Elemente Calcium und Phosphor an den Prüfkörpern der Gruppe n-HA und Darstellung des Ca/P Verhältnisses*

| n-HA   | 1     |       | 2     |       | 3     |       | 4     |       | 5     |       | 6     |       |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|        | S2    | S5    | S2    | S5    | S2    | S5    | S2    | S5    | S2    | S5    | S2    | S5    |
| Ca wt% | 20,22 | 21,46 | 41,86 | 24,87 | 38,73 | 28,78 | 29,56 | 19,95 | 18,19 | 13,39 | 00,00 | 00,00 |
| P wt%  | 9,58  | 10,96 | 18,13 | 11,38 | 19,87 | 14,36 | 14,80 | 9,50  | 10,01 | 7,50  | 00,00 | 00,00 |
| Ca/P   | 2,11  | 1,96  | 2,31  | 2,18  | 1,95  | 2,00  | 2,00  | 2,10  | 1,82  | 1,79  | 00,00 | 00,00 |

*Tabelle 6: Messwerte der intratubulären EDX Analyse (Messpunkte S 2 und S 5) für die Elemente Calcium und Phosphor an den Prüfkörpern der Gruppe n-HA\_E und Darstellung des Ca/P Verhältnisses*

| n-HA_E | 1     |       | 2     |       | 3     |       | 4     |       | 5     |       | 6     |       |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|        | S2    | S5    | S2    | S5    | S2    | S5    | S2    | S5    | S2    | S5    | S2    | S5    |
| Ca wt% | 18,34 | 15,63 | 14,39 | 24,77 | 25,76 | 25,66 | 22,68 | 17,86 | 44,07 | 26,50 | 13,16 | 25,56 |
| P wt%  | 9,03  | 8,17  | 7,12  | 12,15 | 11,84 | 12,41 | 10,37 | 7,93  | 20,84 | 12,62 | 6,34  | 11,53 |
| Ca/P   | 2,03  | 1,91  | 2,02  | 2,03  | 2,18  | 2,06  | 2,18  | 2,25  | 2,12  | 2,10  | 2,07  | 2,21  |

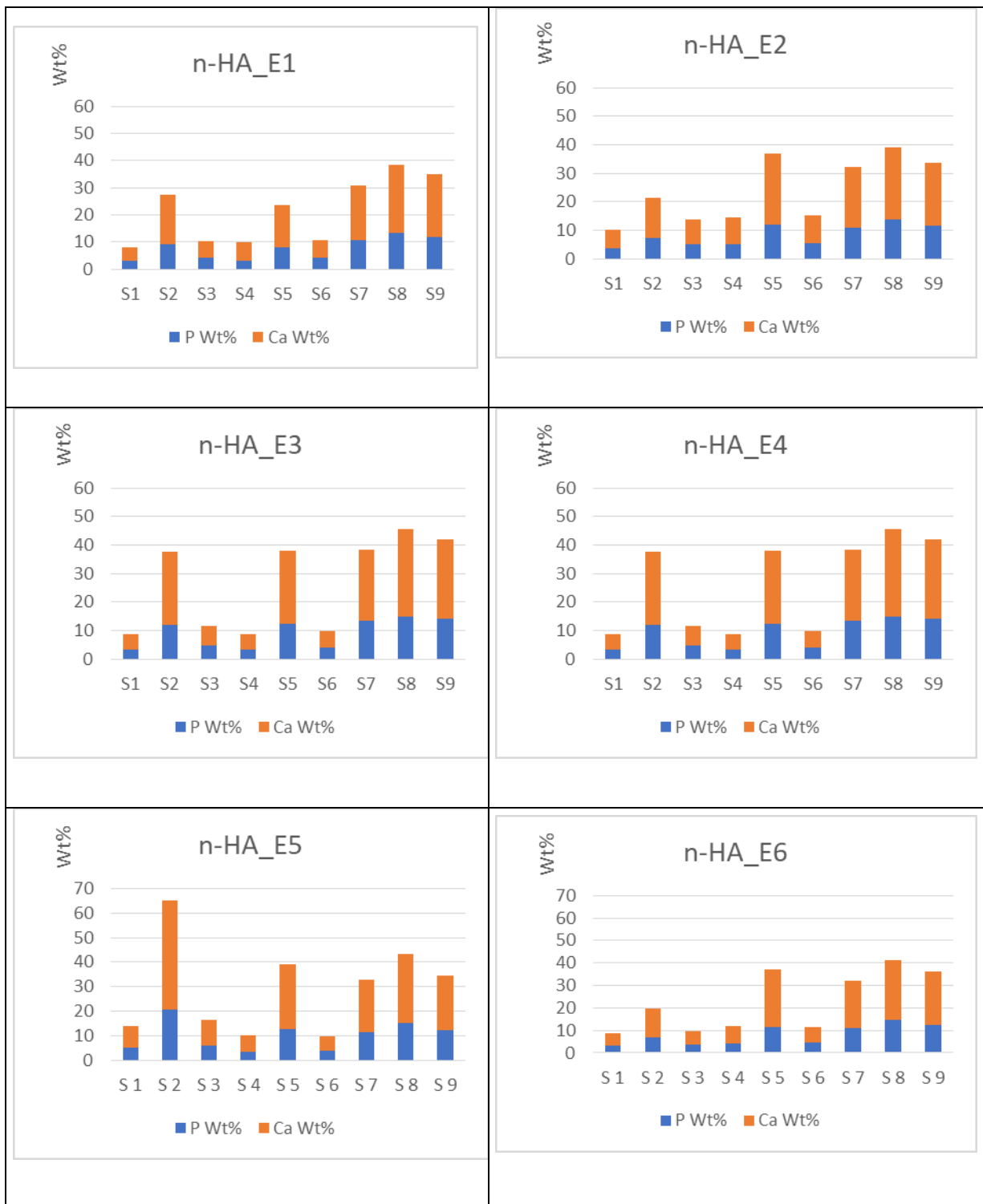


Abbildung 19: Darstellung des Calcium/Phosphor Verhältnisses aus der EDX Analyse bei den Prüfkörpern der Gruppe n-HA\_E; im nicht geätzten Bereich sind bei allen Prüfkörpern an den Messpunkten S 7-S 9 ähnliche Anteile der Elemente Calcium und Phosphor, im geätzten Bereich erscheint das Verhältnis bei den intratubulären Messpunkten S 2 und S 5 größer im Vergleich zu den intertubulären Messpunkten ( S 3 und S 6) und der Gesamtfläche ( S 1 und S 4).

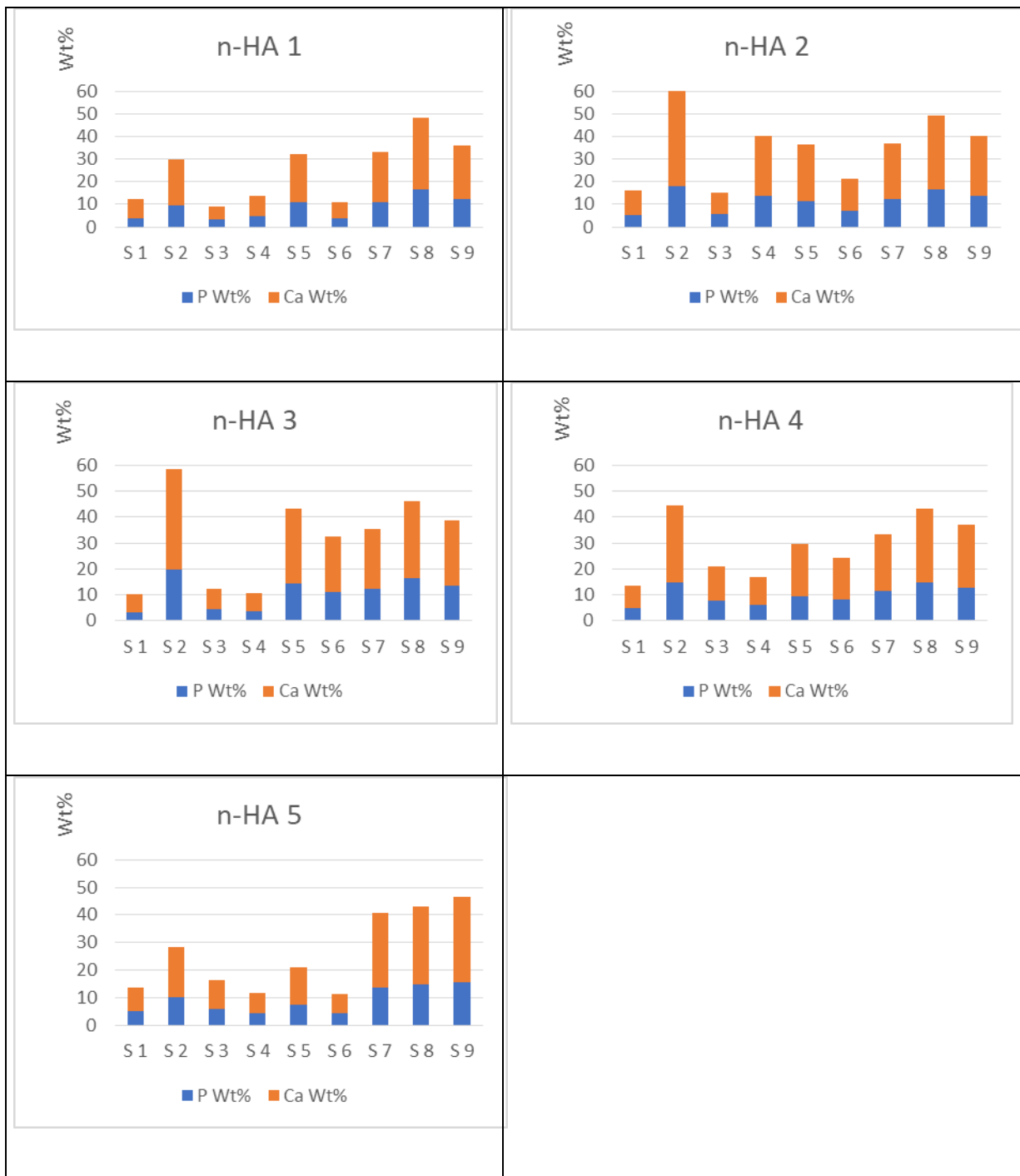


Abbildung 20: Darstellung des Calcium/Phosphor Verhältnisses aus der EDX Analyse bei den Prüfkörpern 1-5 der Gruppe n-HA; im nicht geätzten Bereich sind bei den Messpunkten S 7- S 9 ähnliche Anteile der Elemente Calcium und Phosphor vorhanden, im geätzten Bereich erscheint das Verhältnis bei den intratubulären Messpunkten S 2 und S 5 größer im Vergleich zu den intertubulären Messpunkten ( S 3 und S 6) und der Gesamtfläche ( S 1 und S 4).

Die Elementanalyse des Calcium-Phosphor-Verhältnisses detektiert bei den Prüfkörpern der Gruppe n-HA und n-HA\_E intratubulär (Messpunkte S 2 und S 5) in der geätzten Fläche höhere Ca/P Verhältnisse als in der Gesamtfläche und im intertubulären Dentin (Abb. 19, Abb. 20). Bei der intratubulären Elementanalyse wurden ähnliche Werte für Calcium und Phosphor bei beiden Gruppen gemessen. Die grafische Darstellung der Ca/P Verhältnisses stellt an den Messpunkten S 1-S 6 bei den Prüfkörpern der Gruppe n-HA\_E das größere Verhältnis im Vergleich zum intertubulären Dentin dar. Die hier gefundenen Werte entsprechen den Anteilen auf der nicht geätzten Fläche an den Messpunkten S 7-S 9 (Abb. 19). Ein ebenfalls größeres Verhältnis von Calcium und Phosphor ist bei den intratubulären Messpunkten S 2 und S 5 ist bei der Gruppe n-HA festzustellen. Auch hier erscheinen höhere Relationen intratubulär auf der nicht geätzten Fläche (Abb. 20). Somit ähneln die ermittelten intratubulären Verhältnisse den Werten der nicht geätzten, mit einer Schmierschicht belegten Fläche. Die intratubulär ermittelten Werte lassen auf eine Einlagerung von Hydroxylapatit schließen. In der nicht geätzten Fläche (Messpunkte S 7-9) ergeben sich ähnliche Verhältnisse an allen Messpunkten, was durch die aufgelagerte Schmierschicht oder Präzipitate der experimentellen Mischungen bedingt sein kann.

*Tabelle 7: Ergebnisse der EDX Analyse an den intertubulären Messpunkten (S3 und S6) für das Element Fluor in wt% an allen Prüfkörpern*

| F <sup>-</sup><br>Wt% | 1    |      | 2    |      | 3    |      | 4    |      | 5    |      | 6    |      |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                       | S3   | S6   | S3   | S6   | S3   | S6   | S3   | S6   | S3   | S6   | S3   | S6   |
| n-HA                  | 0,72 | 0,59 | 0,14 | 0,25 | 0,23 | 0,00 | 0,20 | 0,73 | 0,12 | 0,62 | n.g. | n.g. |
| n-HA_E                | 0,70 | 0,74 | 0,69 | 0,90 | 0,45 | 0,62 | 0,34 | 0,46 | 0,50 | 0,76 | 0,80 | 0,62 |
| E                     | 1,65 | 2,39 | 3,18 | 2,08 | 2,53 | 1,77 | 2,99 | 6,47 | 3,50 | 5,69 | 1,10 | 3,01 |
| Ref                   | 0,58 | 0,45 | 0,28 | 0,11 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |



Das Element Fluor konnte in der EDX Analyse in allen Prüfkörpern und den Referenzproben detektiert werden, mit Ausnahme des Prüfkörpers n-HA 3 am Messpunkt S 6 (Tab. 7). Damit ist Fluor im intertubulären Dentin auch nach Applikation der wässrigen Suspension von nano-Hydroxylapatit nachweisbar (0,12-0,72 wt%). Nach Auftragen der n-HA Mischung mit elmex fluid ist ebenfalls bei allen Präparaten Fluor festzustellen gewesen (0,34-0,90 wt%). Deutlich höhere Anteile sind im Dentin der geätzten Fläche nach dem Auftragen von elmex fluid gemessen worden (1,10-6,47 wt%). Die höchsten Anteile ergaben sich bei den Prüfkörpern der Gruppe E allerdings in der nicht geätzten Fläche (Abb. 21). Die Anteile der Elemente Fluor, Phosphor und Calcium sind für alle Prüfkörper vergleichend grafisch dargestellt worden. Die exemplarische Darstellung der Verhältnisse veranschaulicht die deutlich höheren Fluoranteile am Messpunkt P 3.

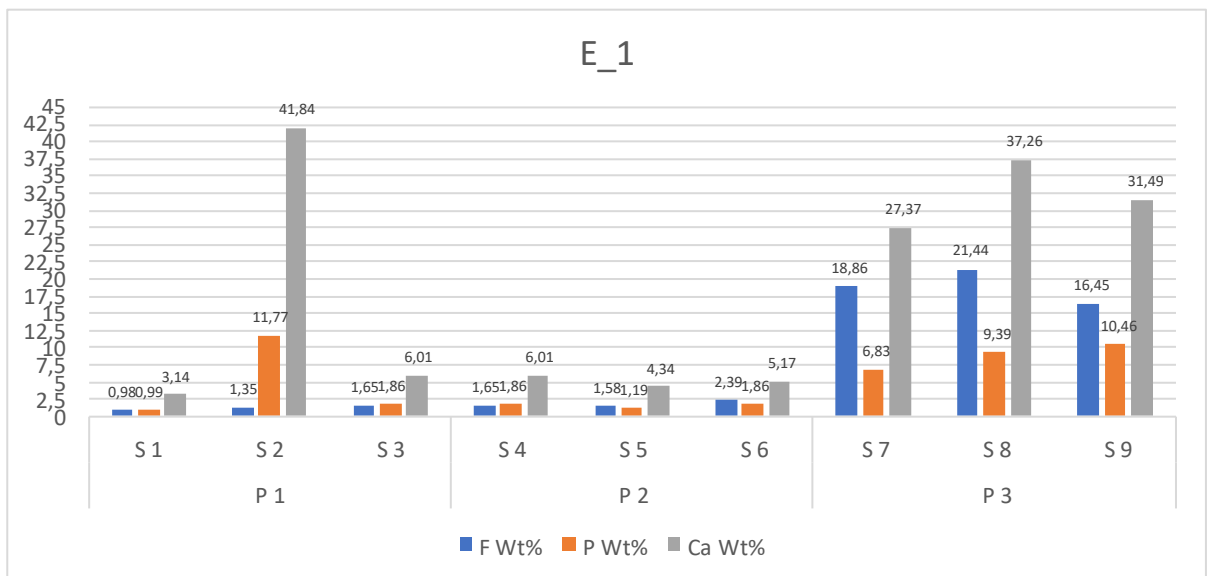
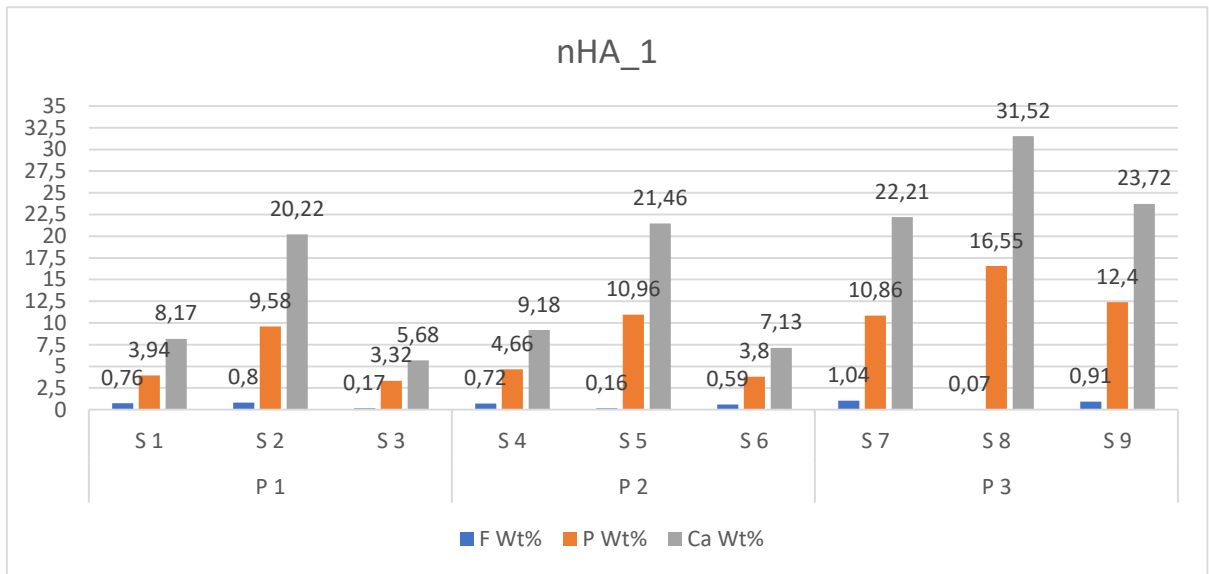
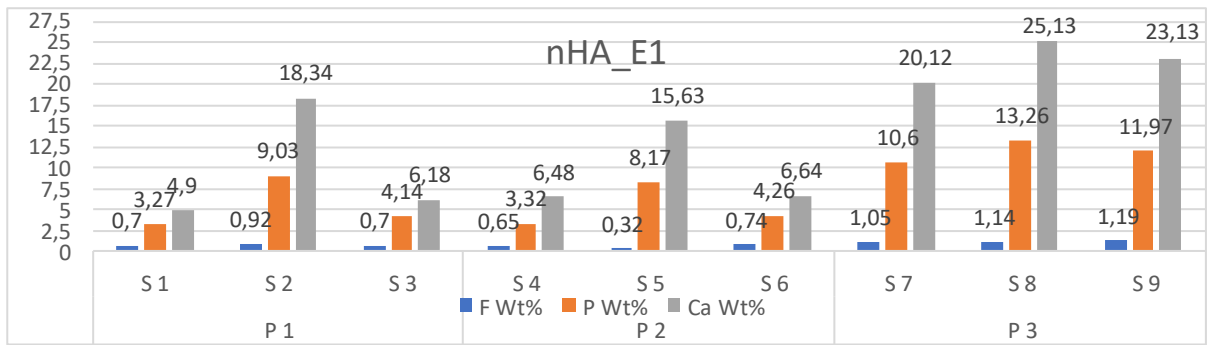


Abbildung 21: Exemplarische Darstellung der Anteile von Fluor, Phosphor und Calcium bei drei Prüfkörpern der Gruppen n-HA, n-HA\_E und E. Nach der Applikation von n-HA ist Fluor nachweisbar. Höhere Werte sind bei dem Monopräparat (E1) in der nicht geätzten Fläche (S 7-S 8) detektierbar. Intratubulär (S 2, S 5) erscheinen bei n-HA und n-HA\_E höhere Werte von Calcium und Phosphor, was auf eine Einlagerung in die Tubuli schließen lässt.

## 6 Diskussion

### 6.1 Prüfkörper

Tierische Proben sind im Vergleich zu humanen Proben leichter zu gewinnen. Um die Wirkung von prophylaktischen und therapeutischen Agenzien auf die Zahnhartsubstanzen zu untersuchen, wurden bovine Inzisiven genutzt (Tschope *et al.*, 2011; Comar *et al.*, 2013; Favretto *et al.*, 2018; Han und Okiji, 2010). Es besteht kein Konsens darüber, ob Struktur und Zusammensetzung der bovinen Proben den humanen Zahnhartsubstanzen gleichen. In einer vergleichenden Untersuchung konnten die Unterschiede von verschiedenen tierischen (bovin, porcin und orcin) Schmelz- und Dentinproben zu humanen Proben dargestellt werden (Ortiz-Ruiz *et al.*, 2018). Die Apatitkristallite waren bei humanem Schmelz und Dentin am größten. Die Apatite verschiedener Spezies unterschieden sich im Gehalt der Spurenelemente und des Carbonates. Es konnten Unterschiede in der Nano-Struktur zwischen den tierischen und humanen Proben gezeigt werden.

Außerdem weisen die Dentintubuli bei Rinderinzisiven größere Durchmesser als humane Proben auf. Es wird vermutet, dass sich kleinere partikuläre Wirkstoffe einfacher und stabiler in die Tubuli einlagern können (Han und Okiji, 2015; Kunam *et al.*, 2016). Untersuchungen an Rinderinzisiven sollten hinsichtlich der partikulären Einlagerungen dementsprechend eingeordnet und bewertet werden. Die in diesem Versuch verwendeten nano-Hydroxylapatit Mischungen führten zu Einlagerungen in die eröffneten Tubuli der humanen Proben. Es konnten in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen nach Applikation der beiden experimentellen Mischungen des nano-Hydroxylapatits partikuläre Einlagerungen in die Tubuli festgestellt werden (Abb. 16. Abb. 17). Hinzu kommt, dass sich die Tubuladurchmesser bei humanen Zähnen bis zur Schmelz-Zement-Grenze verjüngen, im zervikalen Bereich sind geringere Durchmesser zu erwarten. Außerdem schwankt die Dichte der Tubuli, peripher ist die Zahl geringer (Farooq *et al.*, 2015). Die Anzahl und die Durchmesser freiliegender Tubuli sind für die Entstehung von Hypersensibilitäten verantwortlich. Empfindliche Zähne besitzen eine größere Zahl eröffneter Tubuli und die Tubuli weisen einen zum Teil doppelt so großen Durchmesser im Vergleich zu unempfindlichen Zähnen auf (Petersson *et al.*, 2013). Die zu erwartende Anzahl der Tubuli und die Durchmesser der in dieser Untersuchung verwendeten Proben sind kleiner als die bisher untersuchten pulpanahen Dentinprobenkörper, entsprechen aber dem Bereich, der für die Entstehung von Dentinhypersensibilitäten relevant ist (West *et al.*, 2013). Nicht nur die morphologischen und chemischen Unterschiede müssen bei der Verwendung von Dentinproben Beachtung finden, sondern auch die strukturellen Unterschiede im Aufbau von Dentin und Tubuli. Für die Okklusion und Einlagerung in die Tubuli erscheint die Größe der applizierten Apatite bedeutsam. Um eine erste Einschätzung zur Wirksamkeit bei der Therapie hypersensibler Zähne geben zu können, sind in diesem Versuch daher humane Proben verwendet worden. Es konnten partikuläre Einlagerungen nach Applikation beider nano-Hydroxylapatit Mischungen nachgewiesen werden. Dabei scheint auch die Mischung mit Fluoriden

keinen negativen Einfluss auf die Obliteration zu haben. Vermutet werden synergistische Effekte bei der Mischung von nano-Hydroxylapatit mit Natriumfluorid (Kunam *et al.*, 2016). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten in der qualitativen Bewertung der Proben nach der Applikation der Mischung mit Aminfluorid ebenfalls Tubulusverschlüsse.

Bei humanen Prüfkörpern wurden aus kieferorthopädischen Gründen extrahierte Prämolaren (Kulal *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2012), einwurzelige Zähne (Toledano-Osorio *et al.*, 2018) oder Molaren verwendet (Suge *et al.*, 1995; Gillam *et al.*, 1997; Mordan *et al.*, 1997; Arnold *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015, Farooq *et al.*, 2015, Kunam *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2017; Jena *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2017; Baglar *et al.*, 2018; da Cruz *et al.*, 2018; Iafisco *et al.*, 2018; Lucchese *et al.*, 2018; Joao-Souza *et al.*, 2018; Medvecký *et al.*, 2018; Pei *et al.*, 2019). Bei retinierten Weisheitszähnen können die physiologischen Unterschiede von Zähnen minimiert werden. Mordan *et al.* (1997) beschrieben in ihrer Studie die Präparation von Dentinscheiben senkrecht zur Zahnachse unterhalb des koronalen Schmelzes (Mordan *et al.*, 1997). Sie gewannen pro Zahn 2-3 Scheiben in einer Stärke von 1 mm bis zum Erreichen der Pulpa. In den bisherigen Untersuchungen zur Frage der Tubulusokklusion wurde dieses Modell genutzt oder modifiziert angewendet. (Chen *et al.*, 2015; Farooq *et al.*, 2015; Gao *et al.* 2017; Arnold *et al.* 2015; Ma *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2017). Die so gewonnen Dentinscheiben sind leicht zu behandeln und können reproduzierbar gewonnen werden. Allerdings entsprechen sie nicht dem Bereich, der für die Entstehung von Überempfindlichkeiten verantwortlich ist.

Das Modell der Dentinscheibe aus dem über der Pulpa liegenden Dentin wurde bevorzugt, da die hier verlaufenden Dentintubuli bei einer senkrecht zur Zahnachse erfolgten Präparation kreisrunde Anschnitte zeigen. Der weitere Verlauf der Tubuli ist eher bogenförmig, woraus sich schräge Anschnitte ergeben (Enax und Epple, 2016). In der humanen Wurzel ist der Verlauf der Tubuli dagegen eher geradlinig. In der vorliegenden Untersuchung ist nach aktuellem Kenntnisstand erstmalig der für die Entstehung von Hypersensibilitäten relevante zervikale Dentinbereich untersucht worden. Von der von Mordan *et al.* (1997) propagierten Herstellung von Prüfkörpern senkrecht zur Zahnachse wurde abgewichen. Die Präparation erfolgte parallel zur Zahnachse (Abb. 1). Zervikales Dentin und rund angeschnittene Tubuli konnten auf diese Weise dargestellt werden (Abb. 10). In dem gewählten Modell waren qualitative und quantitative Untersuchungen von tubulusokkludierenden Wirkstoffen möglich.

Extrahierte Zähne besitzen andere Eigenschaften zur Beurteilung der physikalischen und chemischen Effekte als Zähne in der Mundhöhle. Zum standardisierten Vergleich verschiedener Behandlungen sind Dentinmodelle extrahierter Zähne geeignet (Gillam *et al.*, 1997). *In vivo* verändert sich das Dentin im Alter. Es wird lebenslang Sekundärdentin gebildet, peritubulär gebildetes Dentin kann bis zum partiellen oder kompletten Verschluss der Tubuli führen. Außerdem nehmen der Pulpainnendruck und die Zusammensetzung der Tubulusflüssigkeit Einfluss auf die Einlagerung von Partikeln in den Tubulus. Die Eiweissbestandteile der Tubulusflüssigkeit verändern die Ausfällungen im Tubulus, zum

Beispiel bei der Applikation glutaraldehydhaltiger Präparate. In einigen Versuchen wurde daher die Tubulusflüssigkeit nachgeahmt und die Proben in einer Lösung von bovinem Serum gelagert (Yilmaz *et al.*, 2017; Joao-Souza *et al.*, 2018).

Um die physiologischen Unterschiede zu minimieren, sind in der vorliegenden Untersuchung nur retinierte Weisheitszähne verwendet worden. Die Auswahl und Kontrolle der ausgewählten Proben ist ein entscheidender Faktor des experimentellen Designs (Mordan *et al.*, 1997). Nach der Extraktion wurden die Zähne in 0,1%iger Thymollösung gelagert. Anhaftende Weichgewebe wurden mit dem Skalpell und einem Rosenbohrer entfernt. Die Präparation der Prüfkörper erfolgte standardisiert parallel zur Zahnachse (Abb. 1). Für jeden Zahn sind zwei Prüfkörper gewonnen worden. Die Proben wurden in Silikonblöcke eingebettet und konnten geschliffen werden. Zudem erlaubte die Einbettung eine Markierung der Schmelz-Zement-Grenze. Eine Hälfte des Prüfkörpers wurde mit einem Abformsilikon abisoliert, sodass in einem Prüfkörper eine geätzte und eine ungeätzte Dentinfläche bewertet werden konnte. Die Konditionierung der Dentinoberfläche zur Eröffnung von Dentintubuli kann mit Phosphorsäure (Han und Okiji, 2015; Iafisco *et al.*, 2018, Toledano-Osorio *et al.*, 2018) Zitronensäure (Gillam *et al.*, 1997; Mordan *et al.*, 1997; Yuan *et al.* 2012; Ma *et al.*, 2017; Medvecký *et al.*, 2018; Da Cruz *et al.*, 2018) oder mit EDTA (Farooq *et al.*, 2015; Kunam *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2017; Joao-Souza *et al.*, 2018; Garofalo *et al.*, 2019) erfolgen. Die durch den Schleifprozess entstandene Schmierschicht wurde durch das im Vorversuch verwendete Ultraschallbad nicht gelöst, die Tubuli erschienen verschlossen und in Umrissen erkennbar (Abb. 10). Es kann davon ausgegangen werden, dass Abrasionsprodukte in die Tubuli eingelagert sind. Von Gillam *et al.* (1997) wurde postuliert, dass *in vivo* die Schmierschicht die Dentinpermeabilität behindert oder signifikant reduziert. Vermutet wurde, dass die so belegte Fläche die Diffusion großer und kleiner Partikel verringert. Sie fanden ebenfalls, dass die Behandlung der Prüfkörper im Ultraschallbad mit destilliertem Wasser den durch die Trennung der Dentinscheiben entstandenen smear layer nicht vollständig entfernt. Erst die Behandlung mit 6%iger Zitronensäure führte zur Eröffnung der Tubuli und Freilegung der intertubulären Fläche.

In den Vorversuchen konnte ein Modell für eröffnete Tubuli mit gleichzeitiger Untersuchung eines mit einer Schmierschicht belegten Dentinareals etabliert werden. Die Vorbehandlung mit 35%iger  $H_3PO_4$  für 15 s erscheint geeignet, die Tubuli zu eröffnen. Durch Rezessionen freiliegende Wurzelentinareale und durch Schmelzdefekte entstandene, freiliegende zervikale Dentinbereiche führen nach der Brännström-Theorie durch eröffnete Dentintubuli zur Schmerzentstehung (Brännström und Aström, 1964). Die in der Rasterelektronenmikroskopie deutlich erkennbaren Tubuluseingänge zeigten, dass ein Modell für überempfindliche Zähne erfolgreich realisiert wurde (Pei *et al.*, 2019).

## 6.2 Applikation und Lagerung

Das tägliche häusliche Zähneputzen ist die am häufigsten angewandte Applikationsart desensibilisierender Agenzien und kann in Putzversuchen simuliert werden. Putzsimulationen führen zu einem Abrieb der Oberfläche, sodass die Abrasionsprodukte Einfluss auf die Tubulusokklusion haben können (Suge *et al.*, 1995, Kunam *et al.*, 2016, Yu *et al.*, 2017, Kulal *et al.*, 2016, Chen *et al.*, 2015). Die Intervalle und die Art der Applikation sind weitere, die desensibilisierende Wirkung beeinflussende Faktoren. Dabei werden wöchentliche Anwendungen beschrieben (Kulal *et al.*, 2016) und die professionelle Applikation mit Polierkelchen (Chen *et al.*, 2015). Die Anwendung von elmex fluid soll nach Herstellerangabe in der zahnärztlichen Praxis erfolgen. In der Prophylaxe wird das fluid 2-mal jährlich zur Anwendung empfohlen. Die Anwendung ist wegen der Gefahr der Fluorose beschränkt. Bereits untersucht wurden Applikationszeiten von bis zu 7 min (Kunam *et al.*, 2016). In den Vorversuchen wurde gezeigt, dass eine Verlängerung der Applikationsdauer auf 10 min zu keiner Verbesserung der Ergebnisse führte. Um die klinischen Bedingungen zu simulieren, wurden die Agenzien in den Hauptversuchen 2 min aufgetragen. Diese Applikationsdauer entspricht den klinischen Anforderungen. Da die Mischungen unterschiedliche Konsistenzen aufwiesen, ist hierin eine Limitation der Methodik zu sehen. Die aufgetragenen Schichten waren nicht gleich und standardisiert. Allerdings entsprachen sie den klinischen Gegebenheiten und können eine Basis für weitere Untersuchungen sein.

Die experimentellen Mischungen sind mit Mikrobrushes aufgetragen worden. Die Applikation erfolgte ohne Druck, sodass ein Abrieb auf der mit Phosphorsäure konditionierten Fläche ausgeschlossen werden kann. Mikrobrushes sind in *In-vitro*-Versuchen bereits als Applikator benutzt worden (Comar *et al.*, 2013; Kunam *et al.*; 2016; Yu *et al.*, 2017). Dadurch wurde gewährleistet, dass nur die Wirkung der applizierten Mittel zur Beurteilung kam und nicht mögliche Abrasionsprodukte. In der häuslichen Zahnpflege können desensibilisierende Mittel, ohne Abrasionseffekte, über Schienensysteme, mit Wattestäbchen oder den Fingerspitzen aufgetragen werden (Amaechi *et al.*, 2018; Low *et al.*, 2015).

Auf der nicht geätzten Fläche der Prüfkörper blieb die durch den Schleifprozess erzeugte aufgelagerte Schmierschicht erhalten. *In vivo* besteht der smear layer neben Abrasionsprodukten des Dentins auch aus Speichelbestandteilen und bakteriellen Bestandteilen. Die in diesem Versuch durch die Isolierung mit einem Silikon erhaltene Schmierschicht machte eine Messung intratubulärer Einlagerungen schwierig bis unmöglich, da es nach Applikation teilweise zu einer kompletten Maskierung der Oberfläche kam. Bei totaler Maskierung der Oberfläche durch Präzipitate sind die Tubuluseingänge entweder nur in Umrissen oder gar nicht erkennbar (Abb. 14). In der vorliegenden Studie wurde im geätzten Bereich exemplarisch ein Tubulus im koronalen und im radikulären Dentin analysiert. Es konnte qualitativ dargestellt werden, dass die verwendeten Mischungen von n-HA das Potenzial zum Verschluss eröffneter Tubuli besitzen und damit eine Therapieoption zur Behandlung überempfindlicher Zähne darstellen (Abb. 14, Abb. 15).

Neben den Abrasionsprodukten können die in den Pflegemitteln enthaltenen Zusatzstoffe Einfluss auf die Tubulusokklusion nehmen. Der Einfluss von den Bestandteilen (e.g. Xylit, Natriumbenzonat, Zink, Natriumlaurylsulfat) in Mundpflegeprodukten auf das orale bakterielle Milieu wird diskutiert (Hellwig *et al.*, 2018). Die in Pflegeprodukten enthaltenen Antioxidantien (e.g. Phloretin, Ferulasäure, Silymarin) sollen außerdem die im Speichel enthaltenen Glykoproteine verändern. Die großen, komplexen organischen Moleküle gelten als Elektronendonatoren. In alkalischem pH sollen sie zu einer verbesserten Einlagerung von Calcium- und Phosphat-Ionen in die auf der Zahnoberfläche aufgelagerte Glykoproteinschicht beitragen. Der Tubulusverschluss soll dadurch verbessert werden (Low *et al.*, 2015). In der vorliegenden Studie wurde eine wässrige Suspension von n-HA mit einem kommerziell erhältlichen fluoridhaltigen Präparat ohne den Einfluss der im Speichel enthaltenen Glykoproteine verglichen. Die Effekte in der Tubulusokklusion waren dabei für elmex fluid am geringsten.

In der vorliegenden Untersuchung erfolgte die Applikation der experimentellen Mischungen einmalig. Dass kleine Applikationsintervalle von nano-Hydroxylapatit zu Effekten führen, konnte bereits klinisch bestätigt werden. Wang *et al.* (2016) zeigten in einer klinischen Studie, dass eine n-HA-haltige, experimentell hergestellte Zahncreme, bereits nach dreimaliger Anwendung im wöchentlichen Abstand zu einer Abnahme der Empfindlichkeit bei den Probanden führte. Wenn eine Wirkung im klinischen Alltag nach so kurzer Zeit zu realisieren wäre, läge darin ein Vorteil bei der Therapie von Hypersensibilitäten durch nano-Hydroxylapatit-haltige Präparate (Wang *et al.*, 2016). In der vorliegenden Studie führte die einmalige Applikation der nano-Hydroxylapatit Mischungen zu qualitativ nachweisbaren Tubulusverschlüssen.

Nach der Applikation sind die Prüfkörper in Wasser geschwenkt worden. Das Abspülen ohne Druck ist eine Möglichkeit, die klinische Anwendung der untersuchten Agenzien zu simulieren. Daher wurden die Prüfkörper für 30 s in *A. dest.* geschwenkt, was das Ausspülen eines Patienten unter klinischen Bedingungen nachempfinden sollte.

Bei *In-vitro*-Untersuchungen über längere Zeiträume müssen die Proben feucht gelagert werden, um ein Austrocknen zu vermeiden. Die Lagerung kann in entionisiertem Wasser (Lin *et al.*, 2017), künstlichem Speichel (Kunam *et al.*, 2016; Farooq *et al.*, 2018; Jena *et al.*, 2017; Pei *et al.*, 2019) oder humanem Speichel (Favretto *et al.*, 2018) erfolgen. In den Vorversuchen wurden die Proben bis zur lichtmikroskopischen Analyse in destilliertem Wasser gelagert. Dabei kann es bei wasserlöslichen Auflagerungen zu Veränderungen der Obliteration kommen. Daher sind im Hauptversuch die Prüfkörper nach dem Schwenken in *A. dest.* getrocknet und direkt der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung zugeführt worden. Im komplexen oralen Milieu ist die bakterielle Besiedlung der Oberflächen eine weitere Herausforderung an desensibilisierende Mittel. Der Biofilm kann die Wirkung applizierter Agenzien verstärken oder behindern (Gao *et al.*, 2017). Dabei scheint die Größe und Form der Kristallite, nadelartig oder kugelförmig, bei der Applikation experimenteller nano-Hydroxylapatit Suspensionen keinen Einfluss auf die Qualität der aufgelagerten Schicht zu haben.

### 6.3 Kritische Betrachtung der Untersuchungsmethoden

Die elektronenmikroskopische Analyse erfordert die Trocknung und Vorbehandlung der Prüfkörper. Beides führt zu Veränderungen der Oberfläche. Im Gegensatz dazu wurde in der vorgelegten Untersuchung zunächst eine lichtmikroskopische Analyse vorgenommen. Die lichtmikroskopische Analyse des Vorversuches war geeignet, in der Fläche die Verschlüsse der Dentintubuli orientierend zu bewerten.

In den Vorversuchen sind Prüfkörper aus allen Gruppen exemplarisch rasterelektronenmikroskopisch untersucht worden. Die gewählten Vergrößerungen erlaubten eine qualitative Bewertung der Tubulusokklusion und der Auflagerungen. Zudem wurden in der EDX Analyse die prozentualen Anteile der Elemente C, N, O, F, Na, Mg, Si, P, S und Ca gemessen. Zur Auswertung wurden im Hauptversuch das Ca/P Verhältnis und der Fluoranteil nach der Applikation der experimentellen Mischungen herangezogen. In der reinen Form enthält Hydroxylapatit 39,68 wt% Calcium und 18 wt% Phosphor. Das molare Ca/P Verhältnis liegt dementsprechend bei 1,67. Wenn Hydroxylapatit aus biologischen Quellen, wie Rinderknochen oder Eierschalen, gewonnen wird, verändert die Einlagerung anderer Ionen dieses Verhältnis (Habibah und Salisbury, 2020).

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zur Frage der Tubulusokklusion beschäftigten sich oft mit der quantitativen Erfassung der Verschlussraten (Chen *et al.*, 2015; Favretto *et al.*, 2018; Farooq *et al.* 2015; Jena *et al.*, 2017; Kulal *et al.*, 2016; Arnold *et al.*, 2015). Daneben wurde in anderen Versuchen die Konfiguration und Eindringtiefe der entstandenen Ausfällungen qualitativ untersucht (Gao *et al.*, 2017; Kunam *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2017). Ein weiteres Kriterium zur Wirksamkeit aufgetragener Mittel sind Messungen der Dentinpermeabilität, die in Kombination mit Messungen der Verschlussraten erhoben wurden (Toledano-Osorio *et al.*, 2018). Die Zusammensetzung von Präzipitaten wurde in Elementanalysen dargestellt (Arnold *et al.*, 2015).

Die quantitativen rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen sollten vorsichtig interpretiert werden. Zum einen wurden in den bisherigen Untersuchungen nur Ausschnitte der jeweiligen Prüfkörper bewertet. Wegen des konischen Verlaufes der Tubuli von der Pulpa zur Schmelz-Dentin-Grenze und in der Wurzel sind in den unterschiedlichen Arealen verschiedene Durchmesser der Tubuli zu erwarten, was Einfluss auf die Einlagerung partikulärer Wirkstoffe hat. Zum anderen verringert sich auch die Zahl der Tubuli im Wurzeldentin, was Vergleiche von Verschlussraten erschwert. Außerdem sind bei totaler Maskierung der Oberfläche die Tubuluseingänge nicht erkennbar. So konnte in der vorliegenden Untersuchung für den Prüfkörper n-HA 6 keine intratubuläre Messung durchgeführt werden (Abb. 15). Um mögliche Einlagerungen in die Tubuli festzustellen, könnten die Versuche mit Bruchpräparaten weitergeführt werden. Die durchgeführte rasterelektronenmikroskopische Analyse ist geeignet, die Qualität der Auflagerungen zu charakterisieren und die Zusammensetzung der Präzipitate zu analysieren. Dabei ist eine Schwierigkeit, zwischen endogenen und exogenen Elementen zu unterscheiden (Gillam *et al.*, 1997). Dies wird bei den Prüfkörpern der Gruppe E deutlich, bei denen in der



intratubulären Messung ein hoher Ca/P Anteil gemessen wurde, obwohl keine partikulären Einlagerungen festzustellen waren. Vermutlich wurde hier das tubuläre Dentin erfasst (Abb. 21).

Der natürliche Tubulusverschluss durch die remineralisierende Wirkung des Speichels und die Sekundärdentinbildung verlaufen langsam. Zahnpflegemittel oder in-office Präparate sollen im Gegensatz dazu bei den Patienten schnell lindernd wirken (Bartold, 2006; Moraschini *et al.*, 2018). Es gibt eine große Zahl von Pflegeprodukten zur Behandlung von Zahnüberempfindlichkeiten. Zahncremes werden als die wirtschaftlichste Methode zur häuslichen Desensibilisierung betrachtet. Trotz der großen Zahl bereits kommerziell verfügbarer Zahnpasten hat sich bisher kein Wirkstoff und keine Wirkstoffkombination für die Therapie durchsetzen können (Amaechi *et al.*, 2018). Wenn nach der häuslichen Anwendung die Hypersensibilität bestehen bleibt, werden therapeutische Maßnahmen in der zahnärztlichen Praxis empfohlen. In diesem Versuch konnte *in vitro* nach einmaliger Applikation einer wässrigen nano-Hydroxylapatit Suspension und einer experimentellen Mischung von n-HA mit elmex fluid eine tubulusokkludierende Wirkung dargestellt werden (Abb. 16, Abb. 17).

Elmex fluid wird in der zahnärztlichen Praxis in der Kariesprophylaxe und in der Therapie von Dentinhypersensibilitäten angewandt. Wegen der Gefahr der Fluorose ist die Häufigkeit der Applikation beschränkt. Bei der professionellen Anwendung erfolgt die Applikation über die vom Hersteller empfohlenen Zeiträume und Intervalle. Fluoride sollen *in vivo* durch die Ausbildung von Calciumfluoridkristallen eine desensibilisierende Wirkung entwickeln.

Hydroxylapatithaltige Mundpflegeprodukte werden ähnlich wie fluoridhaltige angewandt. Sie besitzen den fluoridhaltigen Produkten entsprechende Indikationen. Die Applikation in Mundpflegeprodukten erfolgt in der Regel als Zahnpaste oder Spüllösung. Bei den bereits kommerziell erhältlichen hydroxylapatithaltigen Pflegeprodukten sind Inhaltsstoffe zugefügt, die neben den auf der Verpackung deklarierten, häufig unbekannt sind (Hellwig *et al.*, 2018). Die Zusammensetzung der Produkte als auch die Wirkung der Einzelkomponenten ist jedoch für die klinische Wirksamkeit von Bedeutung. Um den Einfluss von Zusatzstoffen auf die Obliteration von Dentintubuli auszuschließen, sind im Vorversuch wässrige nano-Hydroxylapatit-Suspensionen untersucht worden. Dabei zeigte sich, dass sowohl die wässrige Suspensionen, als auch die Kombinationen mit dem aminfluoridhaltigen elmex fluid obliterierende Wirkungen an den eröffneten Dentintubuli besitzen (Tab. 3, Tab. 4).

Das ideale desensibilisierende Mittel sollte neben dem raschen Wirkeintritt dauerhaft Effekte zeigen, die Pulpa nicht irritieren, schmerzfrei und einfach aufzubringen sein (da Cruz *et al.*, 2018; Priyadarsini *et al.*, 2018). Diesen Anforderungen entsprechen Hydroxylapatite. Als Nanopartikel besitzen sie eine hohe Oberflächenenergie und große Oberfläche, was die Ablagerung auf Tubulusoberflächen begünstigen soll. Daher wird in ihnen ein vielversprechendes Mittel zur Therapie von Hypersensibilitäten gesehen (Amaechi *et al.*, 2018). Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten in den Vorversuchen der vorliegenden Studie darstellen, dass eine Einlagerung von Partikeln

in die Tubuli und Auflagerungen auf die geätzten Dentinflächen nach der Applikation nano-Hydroxylapatit-haltiger Mischungen entstehen (Abb. 11).

#### 6.4 Wirkungen der Agenzien auf der nicht geätzten Fläche

In der Elementanalyse ist der Anteil der Elemente Calcium und Phosphor versuchsgruppenübergreifend in der nicht geätzten Fläche für die intra- und intertubulären Messpunkte ähnlich hoch. Hier scheint die nicht entfernte Schmierschicht für die gefundenen Werte verantwortlich zu sein. Durch den Schleifprozess lagerten sich Dentinanteile in die Tubuli. Der Einfluss der Schmierschicht wurde auch in einem Putzversuch mit kommerziell erhältlichen Zahncremes bestätigt (Lucchese *et al.*, 2018). Als Kriterium wurde neben der Verschlussrate der Tubuli die Dentinpermeabilität herangezogen. Die Proben wurden vor und nach dem Putzen, nach Säureeinwirkung und nach Lagerung in künstlichem Speichel untersucht. Dabei wurde bei einer natriumfluoridhaltigen Zahncreme eine schlechtere Verschlussrate gefunden, die Permeabilität war bei allen untersuchten Zahncremes ähnlich. Nach der Lagerung in Speichel wurden rasterelektronenmikroskopisch verschlossene und teilweise verschlossene Tubuli gefunden. Vermutet wurde, dass bei der 24-stündigen Lagerung mehr Partikel aus den Tubuli gelöst werden, als durch die im Speichel enthaltenen Minerale neu gebildet werden. Die Zahncremes sollen nicht nur wegen ihrer desensibilisierenden Wirkstoffe effektiv, sondern auch durch ihre abrasiven Bestandteile einen smear layer bilden. Amaechi *et al.* (2018) postulierten ebenfalls in ihrer Untersuchung zur Wirksamkeit einer nano-Hydroxylapatit-haltigen Creme, dass nicht nur intratubuläre Ausfällungen zum Tubulusverschluss führen, sondern auch Abrasionsprodukte in Form eines smear layer die Tubuli verschließen können (Amaechi *et al.*, 2018). An bovinen Inzisiven ist eine solche Schicht vor der Applikation potenziell desensibilisierender, kommerziell erhältlicher Mittel durch einen Schleifprozess künstlich erzeugt worden. Vor und nach der Entfernung der Schicht mit EDTA wurden die Proben einer Permeabilitätsuntersuchung unterzogen (Yilmaz *et al.*, 2017). Alle getesteten Mittel führten auf oder in den Tubuli zu morphologischen Veränderungen und einer Abnahme der Permeabilität. *In vivo* führen peritubulären Sklerosierungen und die lokale Bildung von Sekundärdentin neben dem smear layer zur Beeinflussung der Flüssigkeitsbewegungen im Tubulus (Moraschini *et al.*, 2018). Die Schmierschicht scheint in der vorliegenden Untersuchung Einfluss auf die Einlagerung von Fluorid zu besitzen. In der Gruppe E ist in der Elementanalyse der Fluoranteil in der nicht geätzten, mit einer Schmierschicht belegten Fläche, nach der Applikation von elmex fluid deutlich höher als in der geätzten Fläche (Abb. 21). Im Vergleich zu der n-HA\_E Gruppe sind höhere Fluoranteile feststellbar. Fluoride gelten als wirksames Mittel zur Prävention von Karies und zur Remineralisierung initialer kariöser Läsionen. Bei den erzielten Ergebnissen kann eine Einlagerung von Fluorid in die durch die Isolierung mit Silikon nicht veränderte, aufgelagerte Schicht angenommen werden. Die Fluoridionen alleine können unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht zum Tubulusverschluss führen, erforderlich sind Calcium- und Phosphationen und Speichelproteine sowie Abrasionsprodukte (Pettersson, 2013). Nach der Applikation von elmex fluid erschien im nicht

geätzten Bereich das intertubuläre Dentin geglättet (Abb. 18). Nach der Applikation von n-HA und der experimentellen Mischung n-HA\_E bildeten sich sowohl auf der geätzten als auch auf der nicht geätzten Fläche ähnlich geformte Präzipitate. Bei den untersuchten experimentellen n-HA Mischungen erscheinen im nicht geätzten Bereich Auflagerungen bis zur totalen Maskierung der Oberfläche.

## 6.5 Wirkungen der Agenzien auf eröffnete Dentintubuli und konditioniertes Dentin

Die in die Tubuli eingedrungenen Partikel sollen zur Therapie von Hypersensibilitäten einen stabilen Verschluss bilden. Eine intratubuläre Mineralisation durch in die Tubuli eingedrungenes Material wurde an Bruchpräparaten bei Hydroxylapatit, Arginin und Calcium-Carbonat und funktionalisierten Nanopartikeln festgestellt (Arnold *et al.*, 2015). Der Tubulusverschluss wird dabei auf zwei Mechanismen zurückgeführt, die chemische Bindung und die direkte Einlagerung von Kristalliten. Zur intratubulären Mineralisation sind Ionenquellen erforderlich, dann führen reine n-HA Suspensionen zu stabileren Verschlüssen nach Säureeinwirkungen als in Zahncremes enthaltenes Hydroxylapatit. Bisher ist jedoch über die Interaktion von Hydroxylapatit mit der Zahnhartsubstanz unter oralen Bedingungen wenig bekannt (Hellwig *et al.*, 2018).

Die Elementanalyse zeigte bei allen Prüfkörpern im mit Phosphorsäure konditionierten Dentin Unterschiede zwischen den intertubulären Einlagerungen und den intratubulären Auflagerungen. In den ausgewählten Tubuli waren höhere Calcium- und Phosphor-Anteile als auf der intertubulären Fläche messbar (Abb. 19, Abb. 20). Bei den gewählten Versuchsbedingungen scheinen sich stabilere Präzipitate in den Tubuli zu bilden als intertubulär. Allerdings sind diese Anteile auch bei der Gruppe E erhöht, obwohl im rasterelektronenmikroskopischen Bild keine Einlagerung erkennbar ist (Abb. 13, Abb. 21). Vermulich wurde dabei das tubuläre Dentin gemessen.

Bei der Lagerung von Dentinproben in künstlichem Speichel verursachte ein Anstieg von Calcium- und Phosphationen eine oberflächliche Kristallisation mit amorphen Auflagerungen. Bei der vorherigen Anwendung einer fluoridhaltigen Zahncreme lagen nach der Lagerung allerdings die Tubuli frei (Farooq *et al.*, 2015). Die Applikation von elmex fluid ergab in diesem Versuch ebenfalls keine Tubulusverschlüsse (Abb. 13). Es waren in der EDX Analyse dagegen deutlich höhere Fluoranteile im intertubulären Dentin (1,10-6,47 wt%) im Vergleich zu den n-HA Mischungen messbar. Allerdings ist auch nach der Applikation der wässrigen Suspension bis zu 0,73 wt% Fluor im Dentin detektiert worden (Tab. 7).

Die qualitativen Ergebnisse und die Elementanalyse sprechen dafür, eine Kombination von nano-Hydroxylapatit mit Fluoriden unter klinischen Bedingungen weiter zu untersuchen. Die Kombination von Fluoriden mit Trimetaphosphaten zeigte *in vitro* eine signifikant höhere Obliteration von Dentintubuli. Vermutet wurde ein Einfluss der Ladungsverhältnisse auf die oberflächliche Bindung von Trimetaphosphaten unterschiedlicher Partikelgröße (Favretto *et al.*, 2018). Untersucht wurden Nano- und Mikropartikel in experimentell hergestellten fluoridhaltigen Zahncremes. Dabei wurde eine höhere

Tubulusverschlussrate bei beiden Formen der Trimetaphosphate gefunden, verglichen mit einem Placebo und einer fluoridhaltigen Zahncreme. Anionische Phosphate besitzen eine hohe Affinität zu OH- und NH<sub>2</sub>-Gruppen und führen zu einer negativen Ladung der Dentinoberfläche. Durch die Bindung entstehen Kristallisationspunkte für Calciumphosphate. Die Partikelgröße schien dabei, im Gegensatz zur remineralisierenden Wirkung im Schmelz, nur geringen Einfluss zu haben. Es wurde vermutet, dass wegen der größeren Interaktion nach Säureanwendungen das gefundene Calcium-Phosphor-Verhältnis gleichblieb. Das Kollagen des Dentins blieb mineralisiert und die Tubuli verschlossen. Die Autoren sahen bei der Kombination von Fluorid mit Trimetaphosphaten ein großes Potenzial zur Behandlung überempfindlicher Zähne. Sollten sich die in der vorliegenden Untersuchung erzielten Ergebnisse *in vivo* bestätigen lassen, könnte sowohl eine reine nano-Hydroxylapatit Suspension als auch die Kombination mit Fluorid als Therapiemittel für die in-office Behandlung von Hypersensibilitäten und zur Remineralisation in Betracht kommen.

Ob Kombinationen von Fluoriden mit nano-Hydroxylapatit *in vivo* wirksamer sind, ist nach dem bisherigen Wissensstand ungeklärt. Bei der Verwendung von Bioglass (Novamin) soll der Zusatz von Fluoriden die desensibilisierende Wirkung positiv beeinflussen. Es wird angenommen, dass die Bildung stabiler und säureresistenter Fluorapatite neben der Einlagerung von Phosphosilikaten und der Ausfällung von Hydroxylapatit auf der Dentinoberfläche zu einer besseren Behandlung bei Hypersensibilitäten führt (Yilmaz *et al.*, 2017). In der vorliegenden Studie konnte im rasterelektronenmikroskopischen Bild gezeigt werden, dass sowohl bei der wässrigen Lösung von n-HA, als auch bei der experimentellen Mischung mit elmex fluid, sich ähnelnde Auflagerungen auf den Dentinflächen bilden. Es wurden bei beiden Präparaten Einlagerungen in die Tubuli festgestellt. Dabei könnte die Größe der applizierten Apatitkristalle eine Rolle spielen. Kunam *et al.* (2016) vermuteten synergistische Effekte. Den Grund für die obliterierende Wirkung von nano-Hydroxylapatit sahen sie in dem besseren Oberflächen-Volumenverhältnis der Kristallite. Sie sollen sich besser als größere Kristallformen in die Tubuli integrieren können (Kunam *et al.*, 2016).

Weitestgehend ungeklärt ist bisher die Frage der Stabilität der aufgelagerten Schichten und Tubulusverschlüsse im sauren Milieu (Arnold *et al.*, 2015). In einer vergleichenden *In-vitro*-Untersuchung konnte ein oberflächlicher Verschluss dargestellt werden, allerdings waren die Auflagerungen in einem Demineralisationsprozess mit Zitronensäure nicht stabil. Bei keiner der untersuchten kommerziell erhältlichen Zahncremes blieb ein kompletter Verschluss bestehen. Davon auszugehen ist, dass säurehaltige Speisen und Getränke zur Eröffnung der Tubuli im Mundmilieu beitragen, sollte das ideale Mittel zum Tubulusverschluss widerstandsfähig gegen einen pH-Abfall und stabil gegen mechanische Einflüsse der Mundhöhle sein. Alle bisher bekannten Mittel sind nicht stabil bei den täglichen Einflüssen durch Putzen, Ernährung und Speichel (Wang *et al.*, 2016, Yu *et al.*, 2017). Aktive Inhaltsstoffe sollen Tubuli direkt oder nach chemischen Reaktionen verschliessen. Die sich bildenden Kristallformen scheinen neben den Verschlussraten Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des Dentins zu besitzen (Toledano-Osorio *et al.*, 2018).

Fluoride reduzieren die Demineralisation und stoppen die Kariesprogression. Daneben beeinflussen Fluoride die Physiologie der Bakterien im oralen Biofilm. Sie sind in verschiedenen Zusammensetzungen einer Vielzahl von Mundpflegeprodukten zugesetzt. In einer älter werdenden Gesellschaft und bei erfolgreichen parodontalen Therapien ist mit einer Zunahme zervikaler Läsionen zu rechnen. Freiliegendes zervikales Dentin hat wegen seiner geringeren Widerstandsfähigkeit gegenüber einem pH-Abfall ein höheres Kariesrisiko. Eine Vielzahl von verschiedenen Mitteln wird bereits zur Prophylaxe der Wurzelkaries genutzt. Die Kombination einer hochfluoridhaltigen Zahncreme und professionelle Applikation von Chlorhexidin oder Silberdiaminfluorid kann Wurzelkaries inaktivieren oder die Entstehung behindern. In einem systematischen Review zur nicht-invasiven Behandlung von Wurzelkaries konnte nur eine geringe Zahl klinischer Versuche eingeschlossen werden. Die Untersuchung von nano-Hydroxylapatit oder Kombinationen mit anderen Wirkstoffen blieben unberücksichtigt (Wierichs und Meyer-Lueckel, 2015). Wenn neue Wirkstoffe klinisch angewendet werden sollen, müssen Verbesserungen hinsichtlich Anwendung, Kosten und Sicherheit gegenüber etablierten Produkten gegeben sein. Kombinationen sollten bessere Wirkungen als Fluorid allein besitzen (Hellwig *et al.*, 2018).

Die kariespräventive Wirkung von Fluoriden ist mit hoher Evidenz belegt. Dabei lagern sich Fluoridionen in die Apatitkristalle des Zahnschmelzes ein. Das daraus entstandene Fluorapatit besitzt eine höhere Säureresistenz. Die klinische Anwendung bei Dentinhypersensibilitäten beruht auf der Ausbildung einer calciumfluoridhaltigen Deckschicht, die zu einer Obliteration freiliegender Dentintubuli führt. Wenn ein stabiler Verschluss eröffneter Tubuli durch nano-Hydroxylapatit zu erreichen wäre, könnte eine Kombination mit Fluorid einen vielversprechenden Therapieansatz bieten. Weitere Untersuchungen zur Stabilität der Tubulusverschlüsse sind allerdings erforderlich, die die Bedingungen des oralen Milieus berücksichtigen.

## 7 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der Vorversuche zeigten, dass die gewählte Präparationsform der Prüfkörper geeignet war, um die Wirkung tubulusokkludierender Agenzien auf das experimentell freigelegte Dentin an der Schmelz-Zement-Grenze zu untersuchen. Es waren kreisrunde Öffnungen der Tubuli festzustellen. Damit konnte in dem für Dentinhypersensibilitäten relevanten Bereich die Tubulusokklusion untersucht werden.

Die lichtmikroskopische Analyse war in diesem Versuchsaufbau nicht geeignet, Bewertungen über Art und Qualität der erzielten Auflagerungen zu ermöglichen. Daher sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zur qualitativen Bewertung und Elementanalyse der Präzipitate erfolgt. Ausgewertet wurden intratubuläre Einlagerungen und Auflagerungen des intertubulären Dentins. Versuchsgruppenübergreifend ergaben sich in der elektronenmikroskopischen Analyse keine erkennbaren qualitativen Unterschiede bei den experimentellen Mischungen des nano-Hydroxylapatits. Es konnten bei der Applikation von elmex fluid keine Tubulusverschlüsse erreicht werden.

Die Elementanalyse ergab bei beiden nano-Hydroxylapatitgruppen höhere Anteile der Elemente Calcium und Phosphor intratubulär als auf der intertubulären Dentinfläche. Es kann eine partikuläre Einlagerung der Kristallite in die Tubuli vermutet werden. Die Mischung mit elmex fluid führte zu einer Erhöhung des Fluoridgehaltes im demineralisierten Dentin. Aus den Ergebnissen und den vorliegenden Daten der Literatur lässt sich schließen, dass sich Fluoridionen in die Apatitkristalle des Dentins einlagern. Bei einer Kombination beider Präparate könnte die gesicherte kariesprophylaktische Wirkung des Fluorids mit der potenziell desensibilisierenden Wirkung des nano-Hydroxylapatits genutzt werden. Dabei erscheint ein Wirkeintritt nach einmaliger Applikation möglich. Daraus ergeben sich neue Möglichkeiten zur klinischen Therapie von Dentinhypersensibilitäten.

Der gewählte Versuchsaufbau war ein erstes screening, *in vitro* die Wirkung experimentell hergestellter Mischungen von nano-Hydroxylapatit auf das Dentin und die Dentintubuli zu untersuchen. Zusätzlich zur Untersuchung der sofortigen Wirksamkeit ist es wichtig, die Stabilität der Auflagerungen unter Bedingungen zu untersuchen, die das orale Milieu nachahmen, wie mechanische Einflüsse durch das Zähneputzen, Säureattacken und den Einfluss des Speichels. Für weitere Untersuchungen sollten daher die *in vivo* anzutreffenden Bedingungen simuliert werden. Für die klinische Anwendung muß die Stabilität der desensibilisierenden Mittel und die Dauer der Wirkung bekannt sein, um ein adäquates Recall oder Wiederholung der Behandlung zu etablieren. Dabei ist die ideale Konzentration, die mögliche Kombination mit anderen Wirkstoffen und die Häufigkeit der Applikation zu berücksichtigen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die experimentell hergestellte Suspension von nano-Hydroxylapatit und die Mischung mit elmex fluid nach ihrer Applikation auf freiliegende Dentinoberflächen Ausfällungen bilden. Im Gegensatz dazu war nach der Applikation des Fluoridpräparates ohne den Zusatz von nano-Hydroxylapatit kein Verschluss der Dentintubuli festzustellen. Die Nullhypothese wird somit nicht bestätigt.

Der vorliegende *In-vitro*-Versuch kann als Basis für weitere Untersuchungen betrachtet werden.

## 8 Literatur

**Al-Sabbagh, M., Andreana, S., Ciancio, S. G. (2004):**

Dentinal hypersensitivity: review of aetiology, differential diagnosis, prevalence, and mechanism. *J Int Acad Periodontology* 6 (1), 8–12.

**Amaechi, B. T., Lemke, K. C., Saha, S., Gelfond, J. (2018):**

Clinical Efficacy in Relieving Dentin Hypersensitivity of Nanohydroxyapatite-containing Cream: A Randomized Controlled Trial. *TODENTJ* 12 (1), 572–585.

**Arnold, W. H., Prange, M., Naumova, E. A. (2015):**

Effectiveness of various toothpastes on dentine tubule occlusion. *J Dent* 43 (4), 440–449.

**Bae, J.-H., Kim, Y.-K.; Myung, S.-K. (2015):**

Desensitizing toothpaste versus placebo for dentin hypersensitivity: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 42 (2), 131–141.

**Baglar, S., Erdem, U., Dogan, M., Turkoz, M. (2018):**

Dentinal tubule occluding capability of nano-hydroxyapatite; The in-vitro evaluation. *Microsc Res Tech* 81 (8), 843–854.

**Bartold, P. M. (2006):**

Dentinal hypersensitivity: a review. *Aust Dent J.* 51 (3), 212-218.

**Brännström, M., Aström, A. (1964):**

A Study on the mechanism of pain elicited from the dentine. *J Dent Res.* 43, 619–625.

**Brännström, M., Aström, A. (1972):**

The hydrodynamics of the dentine; its possible relationship to dentinal pain. *Int Dent J* 22 (2), 219–227.

**Brännström, M., Lindén, L. A., Aström, A. (1967):**

The hydrodynamics of the dental tubule and of pulp fluid. A discussion of its significance in relation to dentinal sensitivity. *Caries Res* 1 (4), 310–317.

**Brookfield, J. R., Addy, M., Alexander, D. C., Benhamou, V., Dolma, B., Gagnon, V., Gill, K. T. S., Goulding, M. J., Mackie, S., Maillet, W. A., Schwartz, G., Tenebaum, H. C. (2003)**

Consensus-Based Recommendations for the Diagnosis and Management of Dentin Hypersensitivity. *J Can Dent Assoc* 69 (4), 221-6.

**Chen, C. L., Parolia, A., Pau, A., Celerino de Moraes Porto, I. C. (2015):**

Comparative evaluation of the effectiveness of desensitizing agents in dentine tubule occlusion using scanning electron microscopy. *Aust Dent J* 60 (1), 65–72.

**Comar, L. P. (2013):**

Impact of Experimental Nano-HAP Pastes on Bovine Enamel and Dentin Submitted to a pH Cycling Model. *Braz Dent J* 24 (3), 273–278.



- da Cruz, L. P. D., Hill, R. G., Chen, X., Gillam, D. G. (2018):**  
Dentine Tubule Occlusion by Novel Bioactive Glass-Based Toothpastes. *Int J Dent* 2018 (1), 1–10.
- de Melo Alencar, C., de Paula, B. L. F., Guanipa O., Mariangela I., Baraúna Magno, M., Martins Silva, C., Cople Maia, L. (2019):**  
Clinical efficacy of nano-hydroxyapatite in dentin hypersensitivity: A systematic review and meta-analysis. *J Dent* 82, 11–21.
- Enax, J., Epple, M. (2018):**  
Synthetic Hydroxyapatite as a Biomimetic Oral Care Agent. *Oral Health Prev Dent* 16 (1), 7–19.
- Farooq, I., Moheet, I. A., AlShwaimi, E. (2015):**  
In vitro dentin tubule occlusion and remineralization competence of various toothpastes. *Arch Oral Biol* 60 (9), 1246–1253.
- Favretto, C. O., Delbem, A. C. B., Moraes, J. C. S., Camargo, E. R., de Toledo, P. T. A., Pedrini, D. (2018):**  
Dentinal tubule obliteration using toothpastes containing sodium trimetaphosphate microparticles or nanoparticles. *Clin Oral Investig* 22 (9), 3021-3029
- Fernando, D., Attik, N., Pradelle-Plasse, N., Jackson, P., Grosogeat, B., Colon, P. (2017):**  
Bioactive glass for dentin remineralization: A systematic review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 76, 1369–1377.
- Gao, Y., Liang, K., Li, J., Yuan, H., Liu, H., Duan, X., Li, J. (2017):**  
Effect and Stability of Poly(Amido Amine)-Induced Biomineralization on Dentinal Tubule Occlusion. *Materials (Basel)*, 10 (4), 384.
- Garofalo, S. A., Lo S., Machado, A. C., Cunha, S.R., Zezell, D. M., Scaramucci, T., Aranha, A. C. (2019):**  
In Vitro Effect of Innovative Desensitizing Agents on Dentin Tubule Occlusion and Erosive Wear. *Oper Dent* 44 (2), 168–177.
- Ghafournia M., Tehrani M. H., Nekouei A., Faghihian R., Mohammadpour M., Feiz A. (2019):**  
In vitro evaluation of dentin tubule occlusion by three bioactive materials: A scanning electron microscopic study. *Dent Res J (Isfahan)* 16 (3), 166-171.
- Gillam, D. G., Mordan, N. J., Newman, H. N. (1997):**  
The Dentin Disc surface: a plausible model for dentin physiology and dentin sensitivity evaluation. *Adv Dent Res* 11 (4), 487–501.
- Goldberg, M., Kulkarni, A. B., Young, M., Boskey, A. (2011):**  
Dentin: Structure, Composition and Mineralization. The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Front Biosci* 3, 711-35.

**Gopinath, N. M., John, J., Nagappan, N., Prabhu, S., Kumar, E. S. (2015):**

Evaluation of Dentifrice Containing Nano-hydroxyapatite for Dentinal Hypersensitivity: A Randomized Controlled Trial. *J Int Oral Health* 7 (8), 118–122.

**Han L., Okiji T. (2015):**

Dentin tubule occluding ability of dentin desensitizers. *Am J Dent* 28 (2), 90–94.

**Hannig, M., Hannig, C. (2010):**

Nanomaterials in preventive dentistry. *Nat Nanotechnol* 5 (8), 565–569.

**Hellwig, E., Klimek, J., Ganß, C. (2018):** Wirkt es oder wirkt es nicht? Hydroxylapatit in Zahnpasten. <https://www.zm-online.de/archiv/2018/22/titel/wirkt-es-oder-wirkt-es-nicht/>

**Holland, G. R., Narhi, M. N., Addy, M., Gangarosa, L., Orchardson, R. (1997):**

Guidelines for the design and conduct of clinical trials on dentine hypersensitivity. *J Clin Periodontol* 24(11), 808–813.

**Iafisco, M., Degli E. L., Ramírez-Rodríguez, G. B., Carella, F., Gómez-Morales, J., Ionescu, A. C. (2018):**

Fluoride-doped amorphous calcium phosphate nanoparticles as a promising biomimetic material for dental remineralization. *Sci Rep* 8 (1), 4743.

**Jena, A., Kala, S., Shashirekha, G. (2017):**

Comparing the effectiveness of four desensitizing toothpastes on dentinal tubule occlusion: A scanning electron microscope analysis. *J Conserv Dent* 20 (4), 269–272.

**João-Souza, S. H., Machado, A. C., Lopes, R. M., Zzell, D. M., Scaramucci, T., Aranha, A. C. C. (2018):**

Effectiveness and acid/tooth brushing resistance of in-office desensitizing treatments—A hydraulic conductance study. *Arch Oral Biol* 96, 130–136.

**Kensche, A., Kirsch, J., Mintert, S., Enders, F., Pötschke, S., Basche, S. et al. (2017):**

Impact of customary fluoride rinsing solutions on the pellicle's protective properties and bioadhesion in situ. *Sci Rep* 7 (1), 9. DOI: 10.1038/s41598-017-16677-8.

**Kensche, A., Pötschke, S., Hannig, C., Richter, G., Hoth-Hannig, W., Hannig, M. (2016):**

Influence of Calcium Phosphate and Apatite Containing Products on Enamel Erosion. In: *The ScientificWorldJournal* (6):1–12. DOI: 10.1155/2016/7959273.

**Kulal, R., Jayanti, I., Sambashivaiah, S., Bilchodmath, S. (2016):**

An In-vitro Comparison of Nano Hydroxyapatite, Novamin and Proargin Desensitizing Toothpastes - A SEM Study. *J Clin Diagn Res* 10 (10), ZC51-ZC54

**Kunam, D., Manimaran, S., Sampath, V., Sekar, M. (2016):**

Evaluation of dentinal tubule occlusion and depth of penetration of nano-hydroxyapatite derived from chicken eggshell powder with and without addition of sodium fluoride: An in vitro study. *J Conserv Dent* 19 (3), 239–244.

**Leal, A. M. C., Beserra dos Santos, M. V., da Silva Filho, E., C., Menezes Carvalho, A. L., Tabchoury, C. P. M., Vale, Glauber C. (2020):**

Development of an Experimental Dentifrice with Hydroxyapatite Nanoparticles and High Fluoride Concentration to Manage Root Dentin Demineralization. *Int J Nanomedicine* 15, 7469–7479. DOI: 10.2147/IJN.S264754.

**Lin, X., Xie, F., Ma, X., Hao, Y., Qin, H., Long, J. (2017):**

Fabrication and characterization of dendrimer-functionalized nano-hydroxyapatite and its application in dentin tubule occlusion. *J Biomater Sci Polym Ed* 28 (9), 846–863.

**Low, S. B., Allen, E.P., Kontogiorgos, E. D. (2015):**

Reduction in Dental Hypersensitivity with Nano-Hydroxyapatite, Potassium Nitrate, Sodium Monofluorophosphate and Antioxidants. *Open Dent J* 9 (1), 92–97.

**Ma, Q., Wang, T., Meng, Q., Xu, X., Wu, H., Xu, D., Chen, Y. (2017):**

Comparison of in vitro dentinal tubule occluding efficacy of two different methods using a nano-scaled bioactive glass-containing desensitising agent. *J Dent* 60, 63–69.

**Medvecký, L., Stulajterová, R., Giretova, M., Mincik, J., Vojtko, M., Balko, J., Briancin, J. (2018):**

Effect of tetracalcium phosphate/monetite toothpaste on dentin remineralization and tubule occlusion in vitro. *Dent Mater* 34 (3), 442–451.

**Moraschini, V., da Costa, L. S., dos Santos, G. O. (2018):**

Effectiveness for dentin hypersensitivity treatment of non-carious cervical lesions: a meta-analysis. *Clin Oral Invest* 22 (2), 617–631.

**Mordan, N. J., Barber, P. M., Gillam, D. G. (1997):**

The dentine disc. A review of its applicability as a model for the in vitro testing of dentine hypersensitivity. *J Oral Rehabil* 24 (2), 148–156.

**Ortiz-Ruiz, A. J., Teruel-Fernández, J. D., Alcolea-Rubio, L. A., 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* 218, 7–17.

**Pei, D., Meng, Y., Li, Y., Liu, J., Lu, Y. (2019):**

Influence of nano-hydroxyapatite containing desensitizing toothpastes on the sealing ability of dentinal tubules and bonding performance of self-etch adhesives. *J Mech Behav Biomed Mat* 91, 38–44.

**Pepla, E., Besharat, L. K., Palaia, G., Tenore, G., Migliau, G. (2014):**

Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. *Ann Stomatol (Roma)* 5 (3), 108–114.

**Petersson, L. G. (2013):**

The role of fluoride in the preventive management of dentin hypersensitivity and root caries. *Clin Oral Invest* 17 (S1), 63–71.

**Priyadarsini, S., Mukherjee, S., Mishra, M. (2018):**

Nanoparticles used in dentistry: A review. *J Oral Biol Craniofac Res* 8 (1), 58–67.

**Roveri, Norberto; Battistella, Elisa; Bianchi, Claudia Letizia; Foltran, Ismaela; Foresti, Elisabetta; Iafisco, Michele et al. (2009):**

Surface Enamel Remineralization: Biomimetic Apatite Nanocrystals and Fluoride Ions Different Effects. *J Nanomater* 2009 (6), 1–9.

**Schlagenhauf, U., Kunzelmann, K.-H., Hannig, C., May, T. W.; Hösl, H., Gratza, M. et al. (2019):**

Impact of a non-fluoridated microcrystalline hydroxyapatite dentifrice on enamel caries progression in highly caries-susceptible orthodontic patients: A randomized, controlled 6-month trial. *J Invest Clin Dent* 10 (2), S. e12399. DOI: 10.1111/jicd.12399.

**Souza, B. M., Comar, L. P., Vertuan, M., Fernandes N. C. Buzalaf, M. A. R., Magalhaes, A. C. (2015):**

Effect of an Experimental Paste with Hydroxyapatite Nanoparticles and Fluoride on Dental Demineralisation and Remineralisation in situ. *Caries Res* 49 (5), 499–507.

**Splieth, C. H., Tachou, A. (2013):**

Epidemiology of dentin hypersensitivity. *Clin Oral Investig* 17 (Suppl 1), 3-8.

**Suge, T., Ishikawa, K., Kawasaki A., Yoshiyama M.:**

Effects of Fluoride on the Calcium Phosphate Precipitation Method for Dentinal Tubule Occlusion. *J Dent Res* 1995 (74(4)), 1079–1085.

**Sykes, L. M. (2007):**

Dentine hypersensitivity: a review of its aetiology, pathogenesis and management. *SADJ* 62 (2), 66–71.

**Toledano-Osorio, M., Osorio, E., Aguilera, F. S., Medina-Castillo, A. L., Antonio; Toledano, M., Osorio, R. (2018):**

Improved reactive nanoparticles to treat dentin hypersensitivity. *Acta Biomater* <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.033>.

**Tschoppe, P., Zandim, D. L., Martus, P., Kielbassa, A. M. (2011):**

Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *J Dent* 39 (6), 430–437.

**Türp, J. C. (2013):**

Discussion: how can we improve diagnosis of dentin hypersensitivity in the dental office? *Clin Oral Investig* 17 (1), 53-54.

**Vano, M., Derchi, G., Barone, A., Pinna, R., Usai, P., Covani, U. (2018):**

Reducing dentine hypersensitivity with nano-hydroxyapatite toothpaste: a double-blind randomized controlled trial. *Clin Oral Investig* 22 (1), 313–320.

**Wang, L., Magalhães, A. C., Francisoni-Dos-Rios, L. F., Calabria, M. P., Araújo, D., Buzalaf, M. et al. (2016):**

Treatment of Dentin Hypersensitivity Using Nano-Hydroxyapatite Pastes: A Randomized Three-Month Clinical Trial. *Oper Dent* 41 (4), 93-101.

**Wang, T., Yang, S., Wang, L., Feng, H., Ceña, V. (2015):**

Use of Poly (Amidoamine) Dendrimer for Dentinal Tubule Occlusion: A Preliminary Study. *PLoS ONE* 10 (4), 0124735.

**West, N. X., Lussi, A., Seong, J., Hellwig, E. (2013):**

Dentin hypersensitivity: pain mechanisms and aetiology of exposed cervical dentin. *Clin Oral Invest* 17 (1), 9–19.

**Wierichs, R. J., Meyer-Lueckel, H. (2014):**

Systematic Review on Noninvasive Treatment of Root Caries Lesions. *J Dent Res* 94 (2), 261–271.

**Yang, Z.-Y., Wang, F., Lu, K., Li, Y.-H., Zhou, Z. (2016):**

Arginine-containing desensitizing toothpaste for the treatment of dentin hypersensitivity: a meta-analysis. *Clin Cosmet Investig Dent* 8, 1–14.

**Yilmaz, N. A., Ertas, E., Orucoğlu, H. (2017):**

Evaluation of Five Different Desensitizers: A Comparative Dentin Permeability and SEM Investigation. *Open Dent J* 11 (1), 15–33.

**Yu, Q., Liu, H., Liu, Z., Peng, Y., Cheng, X., Ma, K., Ji, Y. (2017):**

Comparison of nanofluoridated hydroxyapatite of varying fluoride content for dentin tubule occlusion. *Am J Dent* 30 (2), 109–115.

**Yuan, P., Shen, X., Liu, J., Hou, Y., Zhu, M., Huang, J., Xu, P. (2012):**

Effects of dentifrice containing hydroxyapatite on dentinal tubule occlusion and aqueous hexavalent chromium cations sorption: a preliminary study. *PloS one* 7 (12), e45283.

## 9 Anhang

|   |   |
|---|---|
| Thymollösung 0,1%                                   |   |
| <i>Aqua dest.</i>                                   |   |
| Skalpellklinge 15                                   | Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland                            |
| Präparationsdiamant 6847 K<br>Finierdiamant 8847 KR | Gebr. Brasseler GmbH u. Co. KG, Lemgo, Deutschland              |
| Polierscheiben SoFlex®                              | 3M Espe Deutschland GmbH, Seefeld, Deutschland                  |
| Bissregistratsilikon Futar D®                       | Kettenbach GmbH u. Co. KG, Eschenburg, Deutschland              |
| Abformsilikon Honigum light®                        | DMG Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH, Hamburg, Deutschland  |
| Ultraschallbad Sonorex®                             | Bandelin electronic GmbH u. Co. KG, Berlin, Deutschland         |
| elmex® fluid<br>elmex® gelee                        | GABA International AG, Therwil, Schweiz                         |
| Messlöffel Teethmate Desentisizer®                  | Kuraray Noritake, Kuraray Europe GmbH, Hattersheim, Deutschland |
| Nano-Hydroxylapatit Kalident                        | Kalichem Italia Srl, Rezzato, Italien                           |
| Mikrobrush Roundtip® Applicator                     | Henry Schein Dental, Melville, New York, USA                    |
| VHX Digital Microscope                              | Keyence Corporation, Osaka, Japan                               |
| Rasterelektronenmikroskop REM XL-30 ESEM            | FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA                             |

## 10 Lebenslauf

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

## 11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Hannig, Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde der Universität des Saarlandes, der die Durchführung dieser Studie ermöglicht hat und mir während der gesamten Arbeit stets zur Hilfe stand.

Herrn Prof. Dr. Rupf und Herrn Prof. Walther für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten an der zahnärztlichen Akademie Karlsruhe.

Herrn Norbert Pütz danke ich für die Betreuung am Rasterelektronenmikroskop und seine Hilfe zur qualitativen Analyse der Ergebnisse.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Ehefrau Dr. Angelika Hofmann-Graß und meinen Kindern Christoph und Paula bedanken, die mich während der Durchführung meiner Arbeit stets bestärkt haben.



Tag der Promotion : 16. Mai 2022

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Matthias Hannig

Prof. Matthias Karl